



UFRPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

**Caracterização genômica de isolados brasileiros de
Paracidovorax citrulli e potencial de nanopartículas de
prata para o controle da mancha aquosa**

David Ferreira Duarte

**Recife – PE
2024**

David Ferreira Duarte

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA ISOLADOS BRASILEIROS DE
Paracidovorax citrulli E POTENCIAL DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
PARA O CONTROLE DA MANCHA AQUOSA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador (a): Elineide Barbosa de Souza

Coorientador (a): Marco Aurélio Siqueira da Gama

Coorientador (a): Dra. Ana Maria Benko Iseppon

**RECIFE – PE
SETEMBRO – 2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Bibliotecário(a): Suely Manzi – CRB-4 809

D812c Duarte, David Ferreira.

Caracterização genômica de isolados brasileiros de *Paracidovorax citrulli* e potencial de nanopartículas de prata para o controle da mancha aquosa / David Ferreira Duarte. – Recife, 2024.

83 f.; il.

Orientador(a): Elineide Barbosa de Souza.

Co-orientador(a): Marco Aurélio Siqueira da Gama.

Co-orientador(a): Ana Maria Benko Iseppon.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, BR-PE, 2024.

Inclui referências.

1. Genoma . 2. Bioinformática. 3. Nanopartículas . 4. Doenças bacterianas das plantas 5. Bactérias fitopatogênicas. I. Souza, Elineide Barbosa de, orient. II. Gama, Marco Aurélio Siqueira da, coorient. III. Iseppon, Ana Maria Benko, coorient. IV. Título

CDD 632

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Paracidovorax*
citrulli E POTENCIAL DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA O CONTROLE DA
MANCHA AQUOSA**

DAVID FERREIRA DUARTE

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 30/09/2024

ORIENTADOR (A):

Prof. Dra. Elineide Barbosa de Souza

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Rosana Blawid

Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama

Prof. Dr. Adriano Márcio Freire Silva

Prof. Dr. Hailson Alves Ferreira Preston

**RECIFE – PE
SETEMBRO – 2024**

"O cosmos está dentro de nós. Somos feitos da mesma substância que as estrelas."
Carl Sagan

*À minha mãe Edna Ferreira de Lima
Duarte e ao meu irmão Tobias Duarte,
por sempre estarem ao meu lado em
todos os momentos.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio institucional, a Capes pela concessão da bolsa.

À professora Elineide Barbosa pela orientação, dedicação, ensinamentos, amizade, carinho, incentivo e principalmente confiança para comigo durante todo doutorado. Meu muitíssimo obrigado, por todos os momentos de aprendizagem na prática, esses momentos foram fundamentais para formar o profissional que sou hoje. Obrigado, obrigado!

Ao Professor Marco Gama pelos ensinamentos, amizade, confiança durante todo percurso do doutorado. Meu muito obrigado, por todos os incentivos na vida acadêmica, profissional e pessoal. Muitíssimo obrigado.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia (PPGF) da Universidade Federal Rural de Pernambuco por todos os ensinamentos compartilhados.

Aos meus familiares, em especial minha mãe, minhas tias, minhas avós e ao meu pai, por sempre estarem ao meu lado nos momentos de felicidades e de tristeza, como também, sempre dando apoio e confiança.

Às minhas avós de criação, Madrinha Lai (*In Memoriam*) e Madrinha Céu (*In Memoriam*).

Aos meus amigos e companheiros do LAFIBAC: Ezechiél, Fernanda, Fabíola, Eduarda, Carina, Winny, Robrigo, Endrick, Andrezza e Frankli, meu muito obrigado por todos os momentos compartilhados dentro e fora do LAFIBAC.

Aos amigos que viraram familiares ao longo de toda jornada: Bruno, Larissa, Ruth, Lucas Lucena, Keyla, Igor, Clara L, Peterson, Felipe Douglas, Indiara, Thamires, Neveka, o meu Muito Obrigado.

À Clínica Fitossanitária de Pernambuco (CLIFIPE-UFRPE), ao Centro de Tecnologia e Geociências – UFPE, ao doutorando Igor do Laboratório de Tecnologia dos Aglomerantes (LabTag) da UFPE, à Central da Analítica do Departamento de Química Fundamental e aos Laboratórios da UnB, pela disponibilidade dos equipamentos para a caracterização das nanopartículas.

E a todos que estiveram e contribuíram de maneira direta e indiretamente, muito obrigado!!

OBRIGADO POR TUDO!!!!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	8
GENERAL ABSTRACT.....	9
CAPÍTULO I.....	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
1. Aspectos gerais e importância da cultura do meloeiro.....	11
2. Mancha aquosa do meloeiro.....	12
3. Mecanismos de patogenicidade de <i>Paracidovorax citrulli</i>	16
4. Genômica comparativa.....	20
5. Síntese verde de nanopartículas metálicas e uso na agricultura.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO II	38
Phylogenomic analysis of <i>Paracidovorax citrulli</i> strains reveals the presence of two lineages in Brazil	38
Abstract	39
Introduction.....	40
Material and Methods	41
Strains, growth conditions, and DNA extraction.....	41
Whole-genome DNA sequencing, assembly, and annotation.....	42
Taxogenomic and phylogenomic analysis.....	42
Crispr-Cas, Presence of plasmids, and Type III and Type IV Secretion System Analyses	42
Results	43
Whole-genome DNA sequencing, assembly, and annotation.....	43
Taxogenomic and phylogenomic analysis.....	43
Crispr-Cas, Presence of plasmids, and Type III and Type IV Secretion System Analyses	44
Discussion	44
Conclusion.....	47
Acknowledgments.....	47
Conflict of Interest	48
Author Contributions	48
Literature Cited	48
Table 1. General characteristics and relevant information of sequenced strains of <i>Paracidovorax citrulli</i> from Brazil	53
Table 2. Occurrence of plasmids in threestrains of <i>Paracidovorax citrulli</i> group I.....	54
CAPÍTULO III	58
SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR EXTRATO DE <i>Momordica charantia</i> E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	58

CONTRA <i>Paracidovorax citrulli</i>	58
RESUMO	59
PALAVRAS-CHAVE: Nanotecnologia; extrato de melão-de-São-Caetano; <i>Cucumis melo</i> ; mancha aquosa, controle alternativo.....	60
ABSTRACT	60
INTRODUÇÃO	61
MATERIAL E MÉTODOS	62
Material vegetal e isolados de <i>Paracidovorax citrulli</i>	62
Síntese verde das AgNPs.....	62
Caracterização das AgNPs	63
Atividade antibacteriana das AgNPs a <i>Paracidovorax citrulli</i>	64
Ensaio da inibição do crescimento bacteriano em meio líquido	64
Ensaio da inibição da motilidade tipo <i>swimming</i>	64
Ensaio da inibição da formação de biofilme	64
Análise Estatística	65
RESULTADOS	65
Síntese verde e caracterização das AgNPs	65
Atividade antibacteriana das AgNPs a <i>Paracidovorax citrulli</i>	69
Ensaio da inibição do crescimento bacteriano em meio líquido	69
Ensaio da inibição da motilidade tipo <i>swimming</i>	72
Ensaio da inibição da formação de biofilme	74
DISCUSSÃO.....	76
Agradecimentos.....	78
Referências.....	79
CAPÍTULO IV	83
CONCLUSÕES GERAIS	83

RESUMO GERAL

A bactéria *Paracitovorax citrulli*, agente causal da mancha aquosa, gera elevados prejuízos em diversas cucurbitáceas, especialmente meloeiro e melancia. No Brasil, a doença se encontra distribuída em oito estados, acarretando perdas de produtividade em meloeiro. *P. citrulli* pode ser dividida em dois grupos: grupo I, que corresponde a isolados provenientes de cucurbitáceas diferentes de melancia; e grupo II, que abriga isolados oriundos de melancia. Diferentes técnicas de manejo são adotadas para o controle da doença, dentre eles: uso de sementes livres do patógeno, aplicação de tratamentos químicos e físico em sementes, aplicação de agentes biocontroladores, além da aplicação de produtos cúpricos, mas surtos da doença ainda são frequentes. Diante deste cenário, a presente pesquisa teve como objetivos realizar uma caracterização genômica de 17 isolados brasileiros de *P. citrulli* e avaliar diferenças taxo e filogenômica entre isolados dos grupos I e II; e sintetizar nanopartícula de prata (AgNPs) a partir de extrato aquoso de folhas de melão-de-São-Caetano visando o controle de *P. citrulli*. Inicialmente, foi realizado o cultivo e a extração do DNA dos 17 isolados, os quais foram sequenciados, montados e realizada a anotação dos respectivos genomas. Para a caracterização foram realizadas as análises de ANI, *d*DDH e Crispr-Cas, detecção de presença de plasmídeo e análises dos sistemas de secreção de tipo III e IV. Para a síntese de AgNPs foram utilizadas folhas de melão-de-São-Caetano e nitrato de prata (AgNO_3). Posteriormente, as nanopartículas foram caracterizadas por meio da técnica de UV-VIS, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, espalhamento de luz dinâmica, microscopia eletrônica de transmissão e difratometria de raios-X. O efeito de AgNPs foi avaliado contra três isolados de *P. citrulli* (CCRMaC1.73, CCRMaC5.3 e CCRMaC1.43) por meio de ensaios da inibição do crescimento bacteriano em meio líquido, da motilidade e da formação de biofilme. Os resultados de ANI e *d*DDH comprovou a identificação de todos os isolados brasileiros como *P. citrulli*. No entanto, verificamos que essas análises não foram suficientes para separar os dois grupos de *P. citrulli*, mas por meio de análise filogenômica constatamos que há uma predominância de isolados pertencentes ao grupo I aqui no Brasil. Além disso, detectamos a presença de dois plasmídeos em três isolados relacionados ao grupo I, e proteínas *cas3* e *cas10* em todos os isolados brasileiros de *P. citrulli*. A predição de proteínas efetoras revelou a proteína XopE/AvrPpHe como diferencial entre as cepas dos grupos I e II. Os resultados da caracterização das AgNPs sintetizadas a partir de folhas de melão-de-São-Caetano estavam dentro dos padrões estabelecidos, indicando AgNPs estáveis. O efeito das AgNPs na inibição do crescimento foi perceptível conforme ocorria o aumento das concentrações de AgNPs, sendo a de $225 \mu\text{mol.L}^{-1}$ capaz de reduzir o crescimento acima de 50% para todos os isolados. As concentrações de $225 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $375 \mu\text{mol.L}^{-1}$ reduziram significativamente a motilidade *swimming* e a formação de biofilme dos três isolados de *P. citrulli*. Concluímos que a maioria dos isolados brasileiros de *P. citrulli* pertencem ao grupo I e, além disso, nosso estudo relata pela primeira vez a presença de dois plasmídeos em três isolados desse grupo I. A síntese verde de AgNPs obtidas do extrato de folhas de melão-de-São-Caetano é relatada pela primeira vez no controle de *P. citrulli*. As AgNPs surgem com uma alternativa eco-friendly, de baixo impacto e com resultados promissores no controle da mancha aquosa.

Palavras-chave: Genômica comparativa; Bioinformática, Síntese verde; AgNPs.

GENERAL ABSTRACT

The bacterium *Paracidovorax citrulli*, the causal agent of water spot, causes significant losses in several cucurbits, especially melons and watermelons. In Brazil, the disease is distributed in eight states, causing productivity losses in melons. *P. citrulli* can be divided into two groups: group I, which corresponds to isolates from cucurbits other than watermelons; and group II, which includes isolates from watermelons. Different management techniques are adopted to control the disease, including: use of pathogen-free seeds, application of chemical and physical treatments on seeds, application of biocontrol agents, and application of copper products, but outbreaks of the disease are still frequent. Given this scenario, the present study aimed to perform a genomic characterization of 17 Brazilian strains of *P. citrulli* and to evaluate taxo- and phylogenomic differences between strains from groups I and II; and synthesize silver nanoparticles (AgNPs) from aqueous extract of melon leaves aiming at the control of *P. citrulli*. Initially, the cultivation and DNA extraction of the 17 strains were performed, which were sequenced, assembled and the respective genomes annotated. For the characterization, ANI, *d*DDH and Crispr-Cas analyses were performed, plasmid presence detection and analysis of type III and IV secretion systems. For the synthesis of AgNPs, melon leaves and silver nitrate (AgNO_3) were used. Subsequently, the nanoparticles were characterized by UV-VIS technique, Fourier transform infrared spectroscopy, dynamic light scattering, transmission electron microscopy and X-ray diffractometry. The effect of AgNPs was evaluated against three *P. citrulli* strains (CCRMAC1.73, CCRMAC5.3 and CCRMAC1.43) by assays of inhibition of bacterial growth in liquid medium, motility and biofilm formation. The results of ANI and *d*DDH confirmed the identification of all Brazilian strains as *P. citrulli*. However, we found that these analyses were not sufficient to separate the two groups of *P. citrulli*, but through phylogenomic analysis we found that there is a predominance of strains belonging to group I here in Brazil. In addition, we detected the presence of two plasmids in three strains related to group I, and *cas3* and *cas10* proteins in all Brazilian strains of *P. citrulli*. The prediction of effector proteins revealed the XopE/AvrPpHe protein as a differential between strains of groups I and II. The results of the characterization of AgNPs synthesized from melon leaves were within the established standards, indicating stable AgNPs. The effect of AgNPs on growth inhibition was noticeable as the concentrations of AgNPs increased, with $225\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ being able to reduce growth by more than 50% for all isolates. The concentrations of $225\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ and $375\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ significantly reduced *swimming* motility and biofilm formation of the three *P. citrulli* strains. We conclude that most Brazilian strains of *P. citrulli* belong to group I and, in addition, our study reports for the first time the presence of two plasmids in three strains of this group I. The green synthesis of AgNPs obtained from melon leaf extract of melon is reported for the first time in the control of *P. citrulli*. AgNPs emerge as an eco-friendly, low-impact alternative with promising results in controlling water stains.

Keywords: Comparative genomics; Bioinformatics, Green synthesis; AgNPs.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Paracidovorax citrulli* E POTENCIAL DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA O CONTROLE DA MANCHA AQUOSA

INTRODUÇÃO GERAL

1. Aspectos gerais e importância da cultura do meloeiro

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma espécie de planta tropical que pertence à família Cucurbitaceae (Lija; Beevy, 2021), possui elevada diversificação e expressivas variações fisiológicas, moleculares e morfológicas, sendo considerada a mais polimórfica do gênero *Cucumis* (Luan *et al.*, 2010). Essa diversificação pode ser verificada em todas as partes da planta, especialmente nos frutos, que diferem quanto ao tamanho, formato, cor e composição química (Fergany *et al.*, 2010).

Diversas classificações intraespecíficas foram propostas para a cultura com base nas variações citadas anteriormente. Um dos aspectos morfológicos importantes que seriam considerados para a classificação desta espécie é a pilosidade dos ovários e com base nesse critério, dividiram a espécie em duas subespécies: *melo* e *agrestis* (Jeffrey, 1980; Lija; Beevy, 2021). Naudin (1859) foi o primeiro a agrupar os cultivares, subdividindo as espécies em nove variedades e apenas uma variedade selvagem, desta maneira, esse estudo se tornou base para as classificações seguintes. Posteriormente Pitrat (2016) descreveu 19 grupos: *acidulus*, *agrestis*, *ameri*, *cantalupensis*, *chandalak*, *chate*, *chito*, *conomon*, *cassaba*, *dudain*, *flexuosus*, *ibericus*, *inodorus*, *indicus*, *kachri*, *makuwa*, *momordica* e *tibish*. No Brasil, dois grupos de cultivares ou variedades de melão são produzidos, var. *inodoro* Naud. e var. *cantalupensis* Naud. (Brito, 2017). O grupo da var. *inodoro* possui casca lisa ou suavemente enrugada com coloração amarela, branca ou verde escura, como também, são mais tolerantes a lesões por transporte e, quando comparado à var. *cantalupensis*, apresentam maior vida útil. Os frutos da var. *cantalupensis* apresentam tamanho médio com casca reticulada, verrucosa ou acidentada e sabor e aroma mais acentuado, sendo os frutos mais doces que os melões do grupo *inodorus*, todavia, possui vida útil precoce (Brito, 2017). Os melões dos “tipos” Canário, Pele de Sapo, Gália e Cantaloupe estão entre as variedades mais cultivadas, especialmente devido às exigências impostas pelo mercado importador quanto à doçura e a firmeza da polpa (Sales Júnior *et al.*, 2004).

A importância socioeconômica do meloeiro se deve ao seu elevado valor comercial relacionado a geração de empregos de maneira direta ou indiretamente. Neste contexto, a

cultura do meloeiro tem se destacado mundialmente ao longo dos anos, sendo atualmente cultivada em mais de 100 países. A China se destaca como maior produtor de melão do mundo, enquanto o Brasil ocupa a 8ª posição no ranking mundial, com produção de 699,281 toneladas (FAOSTAT, 2024). No Brasil, a região Nordeste se destaca com 96,2% da produção nacional de melão, especialmente os estados do Rio Grande do Norte, Bahia e Ceará (IBGE, 2024), onde a cultura se adaptou às condições ambientais como, por exemplo, temperatura, baixa pluviosidade e elevada luminosidade durante a maior parte do ano. Além disso, fatores como uso de insumos de alta tecnologia pelos produtores, como sementes híbridas, irrigação de alta frequência, uso de cobertura morta e cobertura do solo com tecido (Mulching) admite até três ciclos da cultura por ano na mesma área (Nascimento *et al.*, 2018). Na produção do meloeiro participam empresas de médio a grande porte, como também pequenos agricultores, que colaboram com o agronegócio nacional (Moura *et al.*, 2012).

O cultivo do meloeiro em campos abertos é restrito a regiões tropicais e subtropicais com temperatura elevadas. Em climas menos favoráveis durante as estações frias, o melão também é cultivado, neste caso em estufas (Burger *et al.*, 2010). A combinação de monocultura e o uso excessivo das áreas agriculturáveis aumenta o crescimento de microrganismos patogênicos (Nascimento *et al.*, 2018; Sales Júnior *et al.*, 2019). Diversos fitopatógenos causam danos significativos à cultura do meloeiro, todavia a mancha aquosa, também denominada de mancha bacteriana dos frutos, causada pela bactéria *Paracidovorax citrulli* (Schaad *et al.*) Du *et al.*, é tida como a principal doença nos campos produtores de melão (Preston *et al.*, 2020).

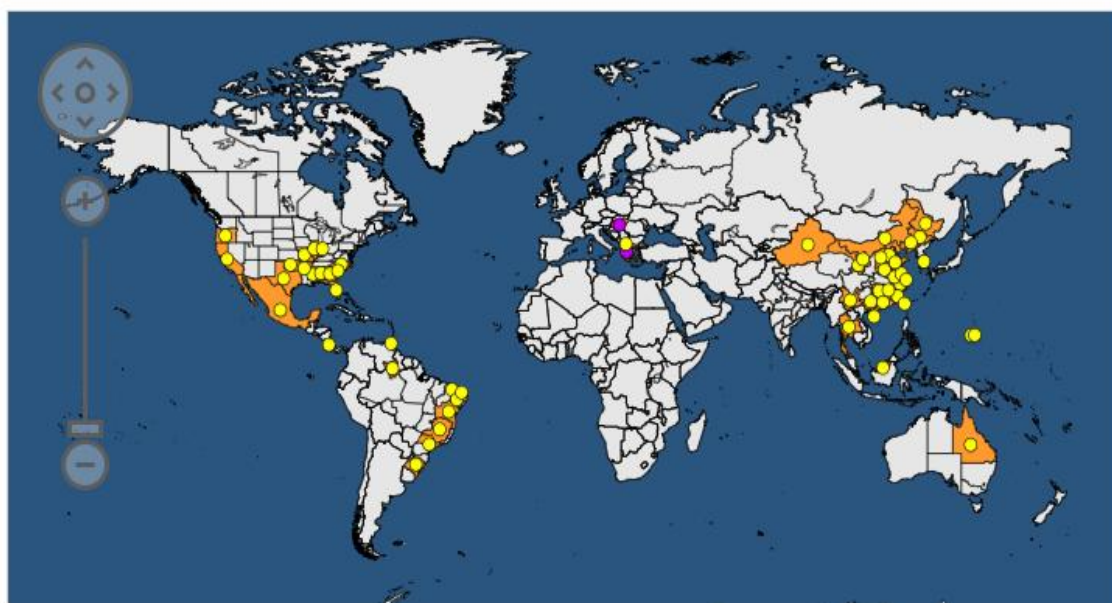
2. Mancha aquosa do meloeiro

Paracidovorax citrulli [ex. *Acidovorax citrulli* (Schaad *et al.*) Schaad *et al.*], agente causal da mancha aquosa do meloeiro, é uma bactéria Gram-negativa, com formato de bastonete, aeróbica, móvel por um flagelo polar (Burdman; Walcott, 2012). Devido ao seu elevado impacto em campos produtores de cucurbitáceas, principalmente em campos de meloeiro e melancia (Citrullus lanatus (Thunb.) Matsum. e Nakai), é considerada uma das espécies de fitobactérias mais importantes pertencente ao gênero *Paracidovorax* (Burdman; Walcott, 2012, 2018; Zhao; Walcott, 2018).

A mancha aquosa teve seu primeiro relato em 1965, nos Estados Unidos, mais especificamente em melancia (Webb; Goth, 1965). Posteriormente, em 1989 a doença foi observada novamente em campos comerciais de melancia na Flórida e Indiana. Após o primeiro relato da doença em melancia, a bactéria foi detectada nos Estados Unidos novamente, entretanto, desta vez na cultura do meloeiro, onde a incidência nos frutos foi

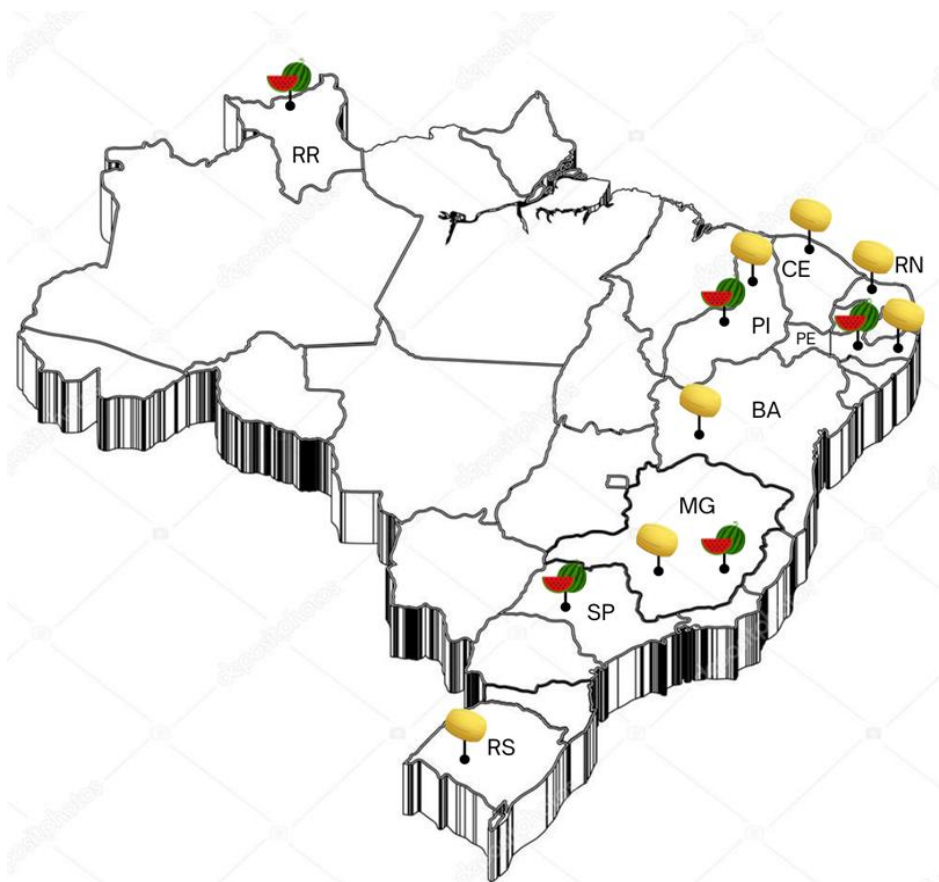
superior a 50% (Isakeit *et al.*, 1997). Atualmente, a mancha aquosa está disseminada em diferentes localidades do território mundial, como América do Sul, América do Norte, Ásia, Europa e Oceania (EPPO 2024) (Figura 1). Devido a exportação de sementes os isolados de *P. citrulli* se disseminaram de maneira elevada, o que aumentou seu impacto nas cucurbitáceas, principalmente em meloeiro e melancieira, tornando-se uma praga quarentenária em diversos países (EPPO, 2016).

Figura 1. Distribuição Global de *Paracidovorax citrulli*: pontos amarelos significam a presença da bactéria e pontos roxos, regiões em processo de erradicação. Fonte: EPPO (2024)



No Brasil, a mancha aquosa foi relatada pela primeira vez em 1992, quando a bactéria foi identificada em plantas de melancieira nos municípios de Assis, Marília e Presidente Pudente, localizados no estado de São Paulo (Robbs; Rodrigues Neto; Berian, 1992). Também em 1992, na cultura do meloeiro, a doença foi assinalada por Robbs, Rodrigues Neto e Berian (1992), nas regiões Nordeste, Centro-oeste e Sudeste. Todavia, apenas em 1997 foi registrado o primeiro impacto econômico da mancha aquosa no Brasil, em áreas produtoras de melão no Rio Grande do Norte (Assis *et al.*, 1999). Atualmente, a doença está disseminada em diferentes estados brasileiros, sendo eles: Bahia, Ceará, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Roraima e São Paulo (Athayde Sobrinho; Noronha; Belmino, 2007; Conceição *et al.*, 2017; EPPO, 2024) (Figura 2).

Figura 2. Distribuição de *Paracidovorax citrulli* no território brasileiro, nas culturas do meloeiro e melancia. Fonte: Adaptado de Souza, Mariano e Conceição (2016).



Os sintomas da doença podem ser observados em todas as fases das culturas, nas mudas, plantas, caules e frutos, sendo mais facilmente detectados nos frutos. Os sintomas nos frutos de meloeiro e melancia são bem semelhantes, sendo observado inicialmente lesões aquosas que progridem para lesões necróticas e, internamente, observa-se uma podridão seca na polpa dos frutos, o que inviabiliza a comercialização. Além disso, é possível observar rachaduras nos frutos de algumas cultivares (Hopkins; Thompson, 2002; Isakeit, 1999; Oliveira *et al.*, 2006; Wechter *et al.*, 2011).

Diversas espécies da família Cucurbitaceae podem ser hospedeiras da bactéria, tendo como destaques o meloeiro e a melancia, como as mais suscetíveis, porém plantas como pepineiro (*Cucumis sativus* L.), aboboreira (*Cucurbita máxima* Duch.), abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), melão citron (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf. var. citroides (Bailey) Mansf.), melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.), e vários tipos de cabaças também são hospedeiros do patógeno (Islam *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020).

Os isolados de *P. citrulli* são divididos em dois grupos, I e II, com base na patogenicidade, utilização de fontes de carbono, análise de ácidos graxos, *fingerprinting* genômicos e análise comparativa do genoma bacteriano (Burdman *et al.*, 2005; Eckshtain-Levi

et al., 2016; Feng *et al.*, 2009; Walcott *et al.*, 2000, 2004). Os grupos I e II de *P. citrulli* também diferem com relação a preferência de hospedeiro. Enquanto os isolados do grupo I são obtidos especialmente de meloeiro e outras cucurbitáceas, com exceção da melancieira; enquanto os isolados do grupo II são obtidos principalmente de melancieira (Walcott *et al.*, 2000, 2004). Em Israel, Burdman *et al.* (2005) também dividiram uma população de isolados de *P. citrulli* em dois grupos distintos (clados), o primeiro estava associado a melancieira e o segundo a outras cucurbitáceas. Contudo, Eckshtain-Levi *et al.* (2014) estabeleceram um novo grupo, o grupo III, composto por isolados moderadamente agressivos a melancieira e a outras cucurbitáceas, em contraste aos grupos I e II no paradigma da agressividade para melancieira proposto por Walcott *et al.* (2004). Em experimento realizado por Zivanovic e Walcott (2017), a inoculação de dois isolados de *P. citrulli* em meloeiro proporcionou crescimento populacional significativo para o isolado M6 (grupo I) em comparação ao isolado AAC00-1 (grupo II), como também a incidência da doença foi menor em mudas de meloeiro exposta aos isolados do grupo II. Um método que claramente diferencia isolados do grupo I e II de *P. citrulli* foi desenvolvido por Yan *et al.* (2017), baseado na patogenicidade em frutos de melão destacados. Os autores observaram uma diferença consistente na patogenicidade entre os isolados dos grupos I e II no fruto, sendo a preferência do patógeno por frutos em relação aos tecidos foliares. Recentemente, experimentos desenvolvidos envolvendo infecção natural em condições de campo fortaleceram mais ainda a interação entre os grupos e os respectivos hospedeiros (Zhao *et al.*, 2020).

No Brasil, a caracterização de 34 isolados de *P. citrulli* oriundos de meloeiro da região Nordeste quanto à agressividade a frutos de meloeiro, utilização de substratos e perfil genômico, indicou baixa diversidade da população. Os isolados formaram um único grupo, correspondendo ao grupo I (Silva *et al.*, 2016b). Em outro estudo, Silva *et al.* (2016a) utilizando PFGE, MLSA e testes de patogenicidade em diferentes espécies de cucurbitáceas também detectaram maior proporção de isolados do grupo I (98%).

Diante do elevado potencial destrutivo da doença, o uso de cultivares resistentes é considerada a maneira mais eficaz do controle, contudo pesquisas indicam que a busca da resistência genética a essa fitobactéria ainda é complexa, sobretudo pelo fato da forte influência do ambiente, baixa herdabilidade e a significativa interação do genótipo e o ambiente (Zhao; Walcott., 2018).

Além do uso de cultivares resistentes, outras técnicas de manejo podem ser utilizadas, como tratamento químico e físico de sementes. Ainda que nenhuma consiga erradicar totalmente *P. citrulli*, essas técnicas reduzem a transmissão da mancha aquosa para as plântulas (Burdman; Walcott, 2012). São recomendados: estreptomicina (Sowell; Schaad, 1979), ácido

clorídrico (1,8%) (Rane; Latin, 1992), ácido láctico (2%) (Santos; Viana, 2000), acibenzolar-S-metil (0,01%), sulfato de estreptomicina (0,1%) (Moraes; Medeiros; Mariano, 2002), kasugamicina (0,1%), oxicleto de cobre (0,5%) (Silva Neto et al., 2003) e ácido peroxiacético (Hopkins; Cucuzza; Watterson, 2003).

O uso do controle biológico vem apresentando resultados promissores no controle de *P. citrulli* e diversas pesquisas têm relatado a eficiência de várias bactérias antagonistas contra *P. citrulli*, como espécies de *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Microbacterium* (Chun-Hao et al., 2015; Fan et al., 2017; Horuz; Aysan, 2018). De acordo com Fan et al. (2017), o isolado 9407 de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn apresentou forte atividade antibacteriana contra *P. citrulli* em experimento *in vitro*. Além disso, demonstrou 61,7% de eficácia de biocontrole em mudas de melão quatro dias após a inoculação em condições de estufa. Resultados promissores também foram constatados por Horuz (2021). Segundo o autor, a aplicação de *Pseudomonas oryzihabitans* Kodama et al. (Ant-12) reduziu o desenvolvimento da doença em 55,8% e a área abaixo da curva do progresso da doença em 66,8%. O pré-tratamento de folhas de pepino com *Paenibacillus tianmuensis* Wu et al. (YM002) aumentou a resistência a *P. citrulli*. Além disso, filtrados da cultura de *P. tianmuensis* YM002 reduziram significativamente a formação de biofilme e a motilidade de *P. citrulli*, o que é indispensável para sua patogenicidade (Koo et al., 2023). Rahimi-Midani; Choi (2020) revestiram sementes de melão com bacteriófago e verificaram uma redução de aproximadamente 27% na severidade da doença, propondo que esse fago poderia ser utilizado no controle da mancha aquosa.

Devido à baixa fonte de resistência nas plantas hospedeiras e ineficácia de outros métodos de controle, uma vez que elevada incidência da doença continuam sendo registradas, ampla gama de hospedeiro, como também a vasta distribuição geográfica e diversidade do patógeno, pesquisas de alternativas de controle da mancha aquosa, a exemplo do uso de nanopartículas, precisam ser realizadas.

3. Mecanismos de patogenicidade de *Paracidovorax citrulli*

As respostas imunes das plantas às infecções por patógenos envolvem duas camadas de imunidade: imunidade desencadeada por padrões localizados na superfície (PTI) e imunidade desencadeada por efetores (ETI) (Boller; Felix, 2009). Os Padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs) são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), que estão localizados na superfície da célula (Liu et al., 2014; Zhang et al., 2020). A resposta de PTI gera uma explosão oxidativa, como também deposição de calose e expressão de genes relacionados à patogênese (PR). A fim de interferir nas respostas de PTI, os patógenos secretam

proteínas (efetoras) que burlam a resposta de PTI das plantas, levando a uma rápida propagação do patógeno (Jones; Dangl, 2006). Os fitopatógenos são capazes de fornecer diversos efetores de proteínas na célula do hospedeiro com objetivo de promover a patogenicidade por meio da alteração do metabolismo da célula hospedeira e a supressão da resposta de defesa do hospedeiro (Feng; Zhou, 2012; Macho; Zipfel, 2015). Todavia, assim como os fitopatógenos têm seu arsenal, as plantas evoluíram ao longo do tempo sendo capazes de reconhecer alguns efetores de patógenos, iniciando uma forte resposta de defesa, chamada de imunidade desencadeada por efetores e é comumente associada a uma resposta hipersensível localizada que detém a infecção por fitopatógenos (Jones; Dangl, 2006; Mansfield, 2009; Mudgett, 2005).

Neste contexto, assim como diversas bactérias causadora de doença de planta, *P. citrulli* utiliza o sistema de secreção para secretar proteínas efetores diretamente na célula do hospedeiro, denominado de sistema de secreção tipo III (SSTIII) (Bahar; Burdman, 2010). Além do SSTIII, *P. citrulli* apresenta outros mecanismos de patogenicidade associados no processo de infecção, sendo eles o sistema de secreção tipo II (SSTII), tipo VI (SSTVI), pili tipo IV (T4P), flagelo polar e *quorum sensing* (QS) (Johnson, 2010; Tian *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

O SSTIII tem como função promover reação de hipersensibilidade, desencadear doenças e liberar proteínas efetoras diretamente nas células hospedeiras (Buttner; Bonas, 2002). Os genes que codificam os componentes do SSTIII são denominados genes *hrp* (reação de hipersensibilidade e patogenicidade) (Tampakaki *et al.*, 2010), os quais podem ser divididos em duas classes: a classe I, representada por *Pseudomonas syringae* Van Hall e *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*, e a classe II, representada por *Xanthomonas* spp. e *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* (Buttner; Bonas, 2002). Por meio do sequenciamento do genoma do isolado AAC00-1 de *P. citrulli* (grupo II), foi possível verificar que o grupo de genes *hrp* pertence à classe II (Burdman; Walcott, 2012). Pesquisas têm demonstrado que os genes *hrpG* e *hrpX* estão diretamente ligados com a regulação do SSTIII (Huang *et al.*, 2009). Zhang *et al.* (2018) verificaram que os genes *hrpG* e *hrpX* de *P. citrulli*, isolado Aac5, em plantas de *Nicotiana tabacum* L. contribuíram para expressão do SSTIII, além de estarem envolvidos na formação do biofilme.

Estudos demonstram que há uma variação entre os efetores do SSTIII dentro dos grupos de *P. citrulli*. Eckshtain-Levi *et al.* (2014), ao verificarem por meio de uma análise comparativa de 11 genes que codificam efetores secretados pelo SSTIII, que 3 dos 11 genes estavam presentes no isolado AAC00-1 de forma conservada e ausentes ou tinham quadro de leitura abertos (ORF) em todas os isolados do grupo I testados. Os autores observaram também que os

outros genes de SSTIII foram detectados ou previstos para codificar produtos funcionais nos grupos I e II, onde a maior parte deles foram altamente conservadas dentro dos respectivos grupos, entretanto agrupados separadamente entre os dois grupos estudados. Pesquisas relatam o papel fundamental da proteína *AopP* na interação entre *P. citrulli*-hospedeiro. Zhang *et al.* (2020) demonstraram que a *AopP* apresenta a capacidade de suprimir a explosão de espécies reativas de oxigênio além do conteúdo de ácido salicílico, colaborando expressivamente para a virulência de *P. citrulli* em melancia. Recentemente, Fujiwara *et al.* (2022) constataram que Aave_4606, um homólogo SSTIII de RipAY presente em *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, identifica tioredoxinas específicas do hospedeiro, que consequentemente ativam a atividade da γ -glutamil ciclotransferase Aave_4606, acarretando a redução da glutatona celular da planta. *AopV* também foi responsável por inibir a defesa da planta ao direcionar a desidratase aromática ADT6 (Jiang *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2020a, b).

Nos últimos anos, houve um progresso na compressão do SSTIII em *P. citrulli*, todavia existe carência de conhecimento sobre como esse sistema participa na interação *P. citrulli* – hospedeiro (Yang *et al.*, 2023). Poucos efetores foram descritos para essa bactéria na literatura, entretanto, segundo Jiménez- Guerrero *et al.* (2020), *P. citrulli* codifica entre 50-60 efetores, tornando-a uma das bactérias com maior quantidade de cargas efetoras.

O SSTII é responsável pela translocação de diversas proteínas relacionadas a patogêneses do citoplasma bacteriano para o ambiente extracelular (Douzi *et al.*, 2012). A sua presença foi confirmada em *P. citrulli* (AAC00-1) pelo uso de um mutante deficiente na produção dos *gspG1/G2*, na qual afetou a capacidade de patógeno em sintetizar endoglucanase (Johnson, 2010). Já o SSTVI aumenta a adaptabilidade das bactérias às condições ambientais (Weber *et al.*, 2009), e está associado a patogenicidade bacteriana, formação de biofilme, colonização e sobrevivência (Ogunyemi *et al.*, 2019).

Além dos sistemas de secreção SSTII, SSTIII e SSTVI, o T4P também é responsável por contribuir para a virulência de *P. citrulli* (Zolghadr *et al.*, 2010). Os pili são apêndices encontrados nas superfícies de diversas bactérias e contribuem para diferentes atividades e características bacterianas, tais como adesão na superfície, colonização, agregação, formação de biofilme, absorção de material genético e, como citado anteriormente, para a virulência (Nudleman *et al.*, 2004; Craig *et al.*, 2004). O gene que codifica a principal subunidade estrutural do T4P é o *pilA*, que tem funções biológicas fundamentais para diversas fitobactérias, como *R. solanacearum* (Kang *et al.*, 2002), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wolf; Foster) Young *et al.* (Taguchi; Ichinose, 2011), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (McCarthy *et al.*, 2008), *P. syringae* pv. *tomato* van Hall (Roine *et al.*, 1998) e *P. citrulli*

(Rosenberg; Salam; Burdman, 2018). Desta forma, a exclusão do gene *pilA* gera perda ou redução da virulência, mobilidade e formação de biofilme de *P. citrulli* (Yang et al., 2023a).

O *pilR-pilS* (um sistema formado por dois componentes) encontra-se presente em muitas bactérias que expressam T4P. Yang *et al.* (2023a) verificaram que após a deleção dos genes *pilR* e *pilS* de *P. citrulli* resultou na regulação negativa da expressão de *pilA*, confirmando assim, que os genes citados acima regulam de forma direta a expressão do gene *pilA*. Além disso, os mutantes apresentaram uma redução significativa da patogenicidade e motilidade de contração *in vivo*. Em outro estudo, verificou-se que o isolado pslb65 pertencente ao grupo I perdeu totalmente sua capacidade de motilidade quando houve deleção do *pilA* (Rosenberg; Salam; Burdman, 2018). Resultados similares foram verificados por Yang *et al.* (2023b), ao estudarem isolados dos dois grupos. Os autores relatam que os mutantes de deleção de *pilA* (pslb65 - $\Delta pilA$ e Aac5 - $\Delta pilA$) apresentaram patogenicidade reduzida quando comparados com o isolado tipo selvagem, como perda total da motilidade de contração e perda parcial da motilidade, pslb65- $\Delta pilA$ e Aac5- $\Delta pilA$, respectivamente. Bahar *et al.* (2010) observaram que os mutantes de *P. citrulli* que apresentavam os genes *pilM* e *pilT* ausentes tinham a motilidade de contração, formação de biofilme e virulência reduzida quando comparado com o isolado do tipo selvagem.

Os flagelos são estruturas filamentosas frequentemente encontradas na superfície de diversas bactérias, onde desempenham um papel crucial na motilidade bacteriana. Além disso, estão envolvidos em processos essenciais, sendo eles adesão, colonização de superfícies e virulência (Macnab, 2003; Duan *et al.*, 2013). Bahar; Levi e Burdman (2011) verificaram que isolado de *P. citrulli* mutante transposon no gene *fliR* apresentou virulência reduzida em experimentos de transmissão de sementes. Análises subsequentes de mutantes de flagelo polar confirmaram que *P. citrulli* necessita do flagelo polar para a virulência em plantas de melão. Em ensaios de inoculação em folhagem e caule, os autores constataram que os flagelos polares desempenham um papel significativo na virulência e no crescimento de *P. citrulli* in planta, tanto na pré como na pós penetração no tecido hospedeiro.

O *quorum sensing* é um mecanismo de comunicação célula a célula usado por bactérias para coordenar a expressão gênica e o comportamento de maneira dependente da densidade populacional (Waters; Bassler, 2005). A N-acil-homoserina lactona (AHL) é a principal classe de moléculas do QS, no qual é regulada por duas proteínas: *LuxI* e *LuxR* (Von Bodman *et al.*, 2003). A importância do QS em isolados de *P. citrilli* foi pesquisado tanto em isolado do grupo I (XJL12) quanto em isolado do grupo II (Aac5) (Chen *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016). Isolados mutantes de *luxI / luxR* e *aacI / aacR* apresentaram virulência e motilidade reduzidas, indicando

o quão é importante a atuação do QS para essa fitobactéria (Chen *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016)

4. Genômica comparativa

O primeiro sequenciamento de um genoma viral completo (ϕ X174), foi publicado em 1977 (Sanger *et al.*, 1977). Para colocar isso em perspectiva, sequenciar o genoma de *Escherichia coli* K-12 de 4,6 Mbp naquele período levaria mais de mil anos para finalizar todo processo, enquanto o sequenciamento do genoma humano levaria mais de um milhão de anos para ser totalmente concluído (Binnewies *et al.*, 2006). Diante deste cenário, a evolução dos métodos de sequenciamento, a invenção da reação em cadeia de polimerase (PCR) (Mullis *et al.*, 1986) e o procedimento de clonagem shotgun minimizaram custos e tempo, e disponibilizaram a capacidade de sequenciamento em larga escala (Binnewies *et al.*, 2006). A junção de todos os procedimentos citados anteriormente, possibilitaram o sequenciamento do primeiro genoma bacteriano completo, a bactéria *Haemophilus influenzae* (Lehmann and Neumann) Winslow *et al.* (patente dos EUA número 6.528.289) (Fleischmann *et al.*, 1995) aproximadamente 20 anos após o sequenciamento do ϕ X174 (Sanger *et al.*, 1977). Os critérios de escolha da primeira bactéria a ser totalmente sequenciada foram: o tamanho do genoma foi considerado “típico” entre bactérias (cerca de 1,8 Mbp), a composição da base G+C era próxima à do genoma humano (38%) e por fim, a bactéria tinha importância para a saúde humana (Binnewies *et al.*, 2006). Na carência de artifícios para gerar um mapa genético para a espécie, o sequenciamento do genoma confirmou ser uma ferramenta poderosa para a caracterização genética (Binnewies *et al.*, 2006).

O sequenciamento do DNA é o procedimento pelo qual se determina a ordem dos nucleotídeos de uma determinada cadeia de polinucleotídeos do DNA, em outras palavras, consiste na leitura do DNA (Vilgis; Deigner, 2018). O sequenciamento trabalha com DNA advindo diretamente do DNA genômico (que armazena a maior parte da informação genética dos organismos) ou com outras moléculas de DNA celular como: DNA mitocondrial, DNA cloroplastídico e DNA plasmidial (Fietto; Maciel, 2015).

Além dos genomas de diversas bactérias causadoras de doenças na saúde humana, genomas de bactérias que acometem doença em plantas estão disponíveis em diversos bancos de dados. A primeira sequência completa de uma bactéria patogênica de planta foi de *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* (Simpson *et al.*, 2000). Informações genômicas de fitobactérias dão a comunidade científica uma rápida noção geral sobre os possíveis mecanismos de virulência com intuito de projetar as abordagens perfeitas de controle de doenças de planta (Xu; Wang.,

2019). A genômica comparativa tem sido amplamente utilizada para explorar os mecanismos de virulência de fitobactérias, podendo ser aplicada em diferentes isolados, sejam eles virulentos ou avirulentos, ou provenientes de distintos locais e hospedeiros. (Xu; Wang., 2019).

Por meio da genômica comparativa Du *et al.* (2023) propuseram uma nova reclassificação para o gênero *Paracidovorax* spp. (anteriormente *Acidovorax* spp.). Os autores estudaram 22 sequências de isolados tipos disponíveis, dentre elas *Acidovorax* e *Comamonas*. Os resultados obtidos pelos autores demonstram que a análise filogenômica apresentou uma melhor resolução na classificação do gênero *Acidovorax*, quando comparado análise baseada apenas no gene 16S rRNA. Além disso, a reconstrução filogenômica mostrou que o gênero *Acidovorax* não deveria ser sustentado sob um gênero único e propôs criação de dois novos gêneros: *Paracidovorax* e *Paenacidovorax*.

Neste contexto, cerca de 22 sequências de *P. citrulli*, dentre elas três genomas completos (Tabela 1), encontram-se disponíveis na plataforma do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (NCBI, 2021). A utilização do sequenciamento do isolado M6 (grupo I) de *P. citrulli* revelou 7,9 milhões de leituras de alta qualidade, como também um tamanho de 4,85 Mb, 139 contigs, percentual de GC% 68,87 e ausência de plasmídeo (Eckshtain-Levi *et al.*, 2016), enquanto o isolado AAC00-1 (grupo II) possui tamanho de 5,35 Mb, 1 contig, percentual de GC% 68,5 e ausência de plasmídeo (Willems *et al.*, 1992). Além disso, com base na análise comparativa entre o isolado M6 e AAC00-1, verificou-se que o genoma M6 é menor do que o AAC00-1. Esse tamanho é explicado especialmente pela ausência em M6 de oito fragmentos de DNA que se encontram presentes em AAC00-1. Os autores indicam que determinantes genéticos presente nesses fragmentos possam diferenciar os dois grupos de *P. citrulli*. Evidências amparam a hipótese que esses fragmentos ou parte deles foram adquiridos por transferência horizontal de genes (HGT) (Eckshtain-Levi *et al.*, 2016).

Tabela 1. Genomas de *Paracidovorax citrulli* disponíveis no NCBI em ago/2024.

Isolado	Comprimento do Genoma (Mb)	GC%	Hospedeiro	BioSample
KACC17005	5.35	68.50	Melancia	SAMN35553891
M6	4.90	68.82	Melão	SAMN04157986
DSM17060	4.85	68.90	-	SAMN04489709
AAC00-1 #5684	5.35	68.50	-	SAMN08775333
AAC00-1 #5596	5.35	68.50	-	SAMN08775340
AAC00-1 #5593	5.35	68.50	-	SAMN08775346
pslb65	4.90	68.80	Melão	SAMN03333326
tw6	5.08	68.60	Melancia	SAMN03268415
EP	5.41	68.50	Berinjela	SAMN13509248
T1	5.62	68.50	Tomate	SAMN13509245
AAC00-1	5.35	68.50	-	SAMN02598334
ZJU1106	4.63	67.80	Melancia	SAMN02472173
NWB SC196	5	69	Melancia	SAMN12418601
NWB SC074	5.3	68.5	Melancia	SAMN12418530
NWB SC107	4.9	69	Melancia	SAMN12418563
HPP21-3-3B	4.9	69	Melancia	SAMN22599710
HPP21-9-4B	4.9	69	Melancia	SAMN22599859
KACC 17913	5.4	68.5	Abóbora	SAMN35553892
KACC17005_2	5.3	68.5	Melancia	SAMN07718226
KACC 18784	5.3	68.5	Pepino	SAMN35553894
KACC 18782	5.3	68.5	Melão	SAMN35553893
KACC 17001	5	69	Melancia	SAMN35553890

Com o avanço tecnológico do sequenciamento genômico, Yang *et al.* (2019) sequenciaram novamente o isolado M6 pela tecnologia PacBio (anteriormente MiSeq Illumina). O sequenciamento PacBio, também denominado de sequenciamento em tempo real de molécula única (SMRT), fornece comprimento de leituras mais longos quando comparados com MiSeq. Desta forma, os autores mencionados anteriormente, realizaram a montagem completa do genoma M6, como também revelaram a presença de um plasmídeo com tamanho de 53 kpb.

Análise comparativa dos isolados M6 (grupo I) e AAC00-1 (grupo II) revelou que as diferenças entre os isolados podem estar associadas a preferência pelos hospedeiros (Yang *et al.*, 2019), relacionadas ao arsenal de efetores liberados pelo SSTIII (Burdman; Walcott, 2012).

Além disso, essa diferença na associação preferencial do hospedeiro entre isolados dos grupos I e II também ocorre em condições de campo, causando infecções em folhas e frutos (Zhao *et al.*, 2020). A genômica comparativa revelou que o isolado T1 quando comparado com o isolado AAC00-1 apresentou um valor de ANI acima de 95%. De maneira semelhante, o isolado EP também demonstrou um valor de ANI acima dos parâmetros estabelecidos ao ser comparado com o isolado AAC00-1 (Chalupowicz *et al.*, 2020). Por meio, da genômica comparativa é possível realizar estudos estruturais e funcionais, além disso o estudo comparativo de genomas bacterianos permite observar a evolução do organismo (SILVA *et al.*, 2016). Não existem pesquisas de genômica comparativa com isolados brasileiros de *P. citrulli*.

5. Síntese verde de nanopartículas metálicas e uso na agricultura

Desde a revolução verde as práticas agrícolas elevaram muito a produção mundial de alimentos, entretanto, essas práticas causaram danos ambientais que precisam de solução. Deste modo, um grande desafio para a sociedade moderna é aumentar a produção de alimentos enquanto lida com as mudanças climáticas e as maiores restrições dos recursos naturais. Além disso, existe uma pressão crescente para desenvolver e implementar manejos agrícolas mais sustentáveis, todavia, essas soluções precisarão proporcionar meios de subsistência adequados para os agricultores e trabalhadores do campo, para assim serem adotadas com sucesso e sustentáveis ao longo do tempo (Muthuramalingam *et al.*, 2024).

Nanopartículas são definidas como qualquer material com uma ou mais dimensões que se encontra na escala de 1-100 nanômetros (Sekhon, 2014). Essa definição pode ser utilizada para qualquer nanopartícula, seja ela produzida de forma sintética ou natural, com diferentes tamanhos, formas e estruturas. O tamanho reduzido das nanopartículas confere características únicas que incluem grande área superficial e alta reatividade (Muthuramalingam *et al.*, 2024). O desenvolvimento da nanotecnologia favoreceu a produção de nanopartículas com diversas aplicações em diferentes áreas de atuação, tais como indústria alimentícia, na área médica, têxtil e, atualmente, na agricultura (Gupta *et al.*, 2015; Mohammad; Ahmad; Zaidi, 2022). O uso da nanotecnologia surgiu como a sexta tecnologia revolucionária após a Revolução Industrial em meados dos anos 1700 e a revolução verde (Naas, 2013), no qual o domínio agrícola tem alcançado constantes melhorias devido à integração da nanotecnologia, disponibilizando novas oportunidades para a pesquisa científica.

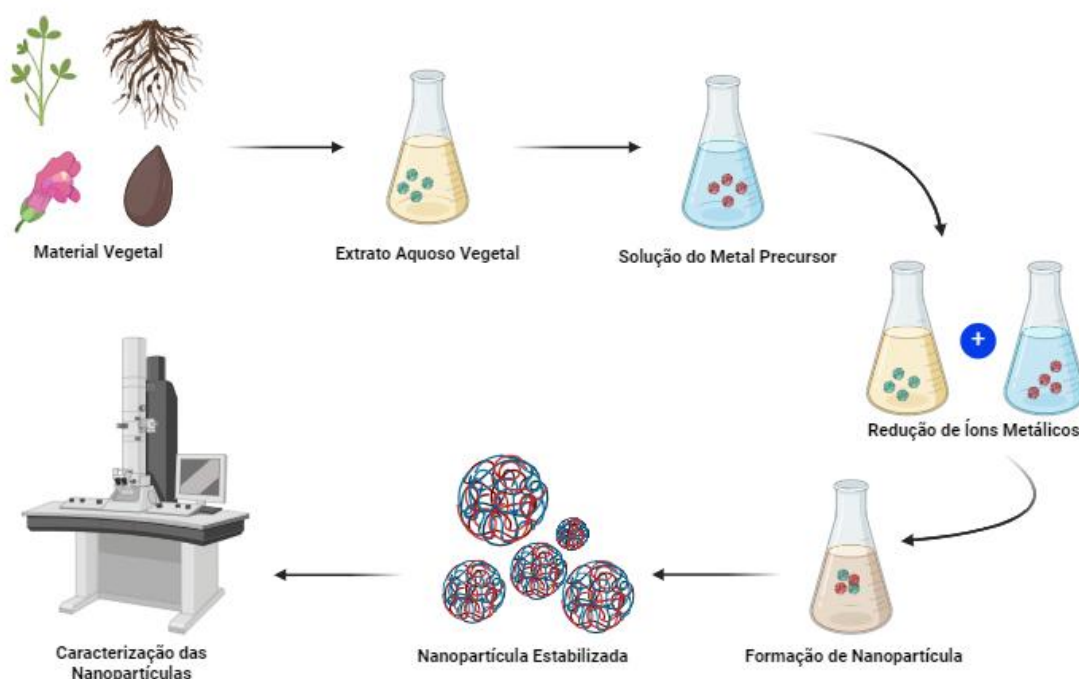
Na agricultura, as nanopartículas podem ser projetadas para utilização em biossensores, como diagnósticos de doenças de plantas e, como transportadoras de cargas-alvos, como ácidos nucleicos e agroquímicos (Muthuramalingam *et al.*, 2024). Há pesquisas demonstrando a

aplicação eficaz de nanopartículas para fornecer agroquímicos e elementos genéticos, minimizando seu uso e evitando riscos para o meio ambiente (Chariou *et al.* 2020; Shidore *et al.* 2021). Além dos diversos usos citados anteriormente, estudos mostraram que as nanopartículas podem melhorar os mecanismos de controle de doenças de plantas causadas por diversos fitopatógenos (Elmer; White 2018; Muthuramalingam *et al.*, 2015)

Ao longo dos anos, a síntese de nanopartículas sofreu mudanças notáveis em direção a abordagem mais sustentável e ecologicamente correta. Os métodos de síntese convencionais envolvem a utilização de produtos químicos perigosos e etapas que requerem alta energia, desta maneira gerando preocupações ambientais e sintetizando subprodutos tóxicos (Osman *et al.*, 2024). Diante das limitações dos métodos convencionais, os métodos de síntese verde (síntese mediada por microrganismos, resíduos agrícolas e plantas) fornecem uma solução viável como fontes ecologicamente corretas para síntese de nanopartículas (Karim *et al.* 2023; Xu *et al.* 2023).

A síntese mediada por plantas atraiu atenção significativa devido à abundância e diversidade de espécies vegetais que fornecem uma rica fonte de compostos bioativos para a produção de nanopartículas (Monga *et al.* 2020; Rashwan *et al.* 2023a). Diferentes partes das plantas, como folhas, raízes, caule e sementes possuem capacidade de reduzir e estabilizar íons metálicos, facilitando a formação de nanomateriais (Brar *et al.*, 2022). Resumidamente, o extrato da planta é adicionado à solução do metal precursor, que reduz os íons metálicos a átomos neutros e, conseqüentemente os agrega e, então, o extrato da planta é utilizado como agentes de cobertura para produzir de maneira estável nanopartículas metálicas (Figura 3).

Figura 3. Ilustração esquemática da síntese de nanopartículas (NPs) mediada por plantas. Imagem produzida com BioRender.

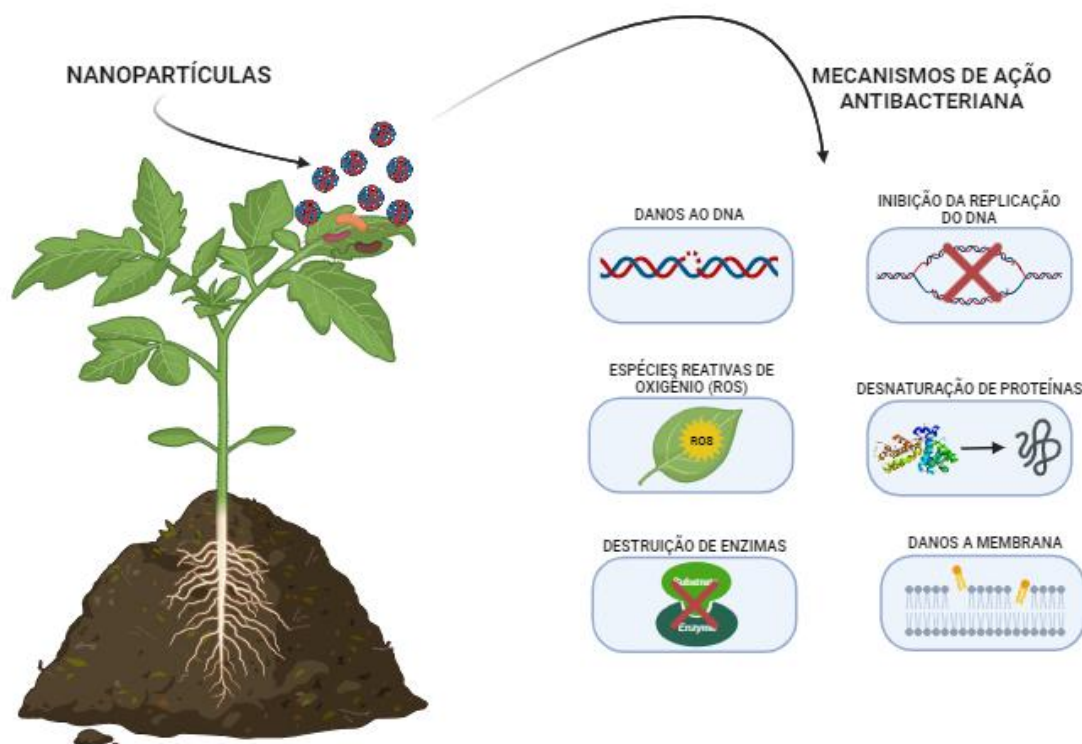


Extratos vegetais utilizados para produzir nanopartículas metálicas podem ser considerados sustentáveis se tratando do aspecto ambiental, isso devido as plantas possuírem um amplo espectro de biomoléculas que podem atuar como agentes redutores, estabilizadores e de encapsulamento (Duran *et al.* 2005, 2011; Narayanan e Sakthivel 2010). Nanopartículas de prata, cobre e zinco apresentam propriedades antimicrobianas sendo uma considerável alternativa no manejo de doenças de plantas (Chauhan; Tapwal., 2023).

A síntese verde de nanopartículas pode atuar no controle de bactérias fitopatogênicas por meio de dois mecanismos principais (Figura 4). O primeiro consiste na indução de estresse oxidativo pelas nanopartículas, levando à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Besinis *et al.*, 2014). Essas ROS causam danos à estrutura interna das bactérias, incluindo danos ao DNA, inibição da replicação do DNA, desnaturação de proteínas e destruição de enzimas essenciais (Jiang *et al.*, 2022). O segundo mecanismo envolve os íons metálicos liberados pela dissolução do metal na superfície das nanopartículas, que penetram nas bactérias por contato físico direto ou assimilação. Esses íons, então, comprometem a estrutura interna das bactérias ou destroem sua membrana celular (Jiang et al., 2022). Além disso, a morfologia e as propriedades físico-química das nanopartículas parecem afetar sua atividade antibacteriana (Mohammadi *et al.*, 2011; Seil; Webster, 2012), isso porque nanopartículas que possuem

tamanhos menores têm maior eficiência no controle de bactérias (Besinis *et al.*, 2014; Fellahi *et al.*, 2013; Mohammadi *et al.*, 2011). A forma estrutural das nanopartículas também pode levar a um efeito bactericida mais aprimorado (Seil; Webster, 2012).

Figura 4. Mecanismos molecular das nanopartículas contra fitobactérias. Imagem produzida com BioRender.



Com os avanços tecnológicos na agricultura, o campo inovador da “agronanotecnologia” tem desempenhado um papel significativo na Fitopatologia (Elmer; White, 2018; Worrall *et al.*, 2018). Pesquisas recentes utilizando nanopartículas de prata biossintetizadas têm mostrado resultados promissores no manejo de fitobactérias. Santiago *et al.* (2019) sintetizaram nanopartículas de prata a partir de diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas de tomateiro, encapsularam-nas com quitosana e obtiveram excelentes resultados no controle de *R. solanacearum*. Ao realizarem a síntese de nanopartícula de prata a partir de três extratos vegetais distintos (*Arctium lappa* L. – Fruto, *Solanum melongena* L. – Folhas e *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. – Folhas) Tian *et al.* (2022), verificaram que a inibição do crescimento bacteriano de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama) Swings *et al.* foi aumentando conforme o aumento das concentrações de nanopartículas estudadas (5, 10 e 20 µg/mL). Segundo os autores, as três nanopartículas sintetizadas por três diferentes extratos

aquoso de plantas inibiram fortemente a formação do biofilme e motilidade bacteriana. Resultados similares foram observados quando nanopartícula de prata sintetizada por meio do extrato aquoso de *Moringa oleifera* L. (AgNPs-Mo) foi testada no controle de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Carlson and Vidaver (Mercado-Meza *et al.*, 2023). Os autores observaram que a aplicação preventiva de AgNPs-Mo (32 nm; formato quase esférico) apresentaram potencial antibacteriano, ao reduzir a severidade do cancro bacteriano do tomateiro em 89,29% após 29 dias de experimentação usados como tratamentos curativos ou preventivos. Diante deste cenário, a nanotecnologia surge como alternativa que oferece novas ferramentas no controle de fitopatógenos (Castillo-Henríquez *et al.*, 2020).

Visando aprimorar o entendimento sobre a estrutura genômica de isolados brasileiros de *P. citrulli* e avaliar novas estratégias para o manejo da mancha aquosa, este trabalho teve como objetivos: 1. Realizar uma caracterização genômica de isolados brasileiros de *P. citrulli*; e 2. Sintetizar nanopartículas de prata mediada por extrato aquoso da folha de melão-de-São-Caetano e avaliar o efeito no controle de *P. citrulli*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, P. K.; CUNNINGHAM, A. A.; PATEL, N. G.; MORALES, F. J.; EPSTEIN, P. R.; DASZAK, P. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 10, p. 535-544, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.021>
- ASSIS, S. M. P.; MARIANO, R. L. R.; SILVA-HANLIN, D. M. W.; DUARTE, V. Mancha aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* no estado do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 191, 1999.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; NORONHA, M. A.; BELMINO, C. S. **Ocorrência da mancha-aquosa da melancia no estado do Piauí**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2007. 3 p. (Comunicado técnico, 200).
- BAHAR, O.; BURDMAN, S. Bacterial fruit blotch: a threat to the cucurbit industry. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 58, n. 1, p. 19-31, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1560/IJPS.58.1.19>
- BAHAR, O.; DE LA FUENTE, L.; BURDMAN, S. Assessing adhesion, biofilm formation and motility of *Acidovorax citrulli* using microfluidic flow chambers. **FEMS Microbiology Letters**, v. 312, n. 1, p. 33-39, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02094.x>
- BAHAR, O.; LEVI, N.; BURDMAN, S. The cucurbit pathogenic bacterium *Acidovorax citrulli* requires a polar flagellum for full virulence before and after host-tissue penetration. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 9, p. 1040-1050, 2011. DOI: [10.1094/MPMI-02-11-0041](https://doi.org/10.1094/MPMI-02-11-0041)
- BESINIS, A.; DE PERALTA, T.; HANDY, R. D. The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on *Streptococcus mutans* using a suite of bioassays. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.742935>
- BINNEWIES, T. T.; MOTRO, Y.; HALLIN, P. F.; LUND, O.; DUNN, D., LA, T., HAMPSON, D. J.; BELLGARD, M.; WASSENAAR, T. M.; USSERY, D. W.; Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries. **Functional & Integrative Genomics**, v. 6, p. 165-185, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10142-006-0027-2>

- BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 379-406, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- BRAR, K. K.; MAGDOULI, S.; OTHAMANI, A.; GHANEI, J.; NARISSETTY, V.; SINDHU, R.; BINOD, P.; PUGAZHENDHI, A.; AWASTHI, M. K.; PANDEY, A. Green route for recycling of low-cost waste resources for the biosynthesis of nanoparticles (NPs) and nanomaterials (NMs)-A review. **Environmental Research**, v. 207, p. 112202, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112202>
- BRITO, E. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de variedades de melão (*Cucumis melo* L.) comercializadas no Brasil e determinação do teor de glutatona reduzida (GSH)**. Doctorate Thesis. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017
- BURDMAN, S.; KOTS, N.; KRITZMAN, G.; KOPELOWITZ, J. Molecular, physiological, and host range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. **Plant Disease**, v. 89, n. 12, p. 1339-1347, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-89-1339>
- BURDMAN, S.; WALCOTT, R. O. N. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 8, p. 805-815, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00810.x>
- BURGER, Y.; PARIS, H. S.; COHEN, R.; KATZIR, N.; TADMOR, Y.; LEWINSOHN, E.; SCHAFFER, A. A. Genetic Diversity of *Cucumis Melo*. **Horticultural reviews**, v. 36, n. 1, p. 165-198, 2010.
- BUTTNER, D.; BONAS, U. Getting across—bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. **The EMBO journal**, v. 21, n. 20, p. 5313-5322, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf536>
- CAMPOS, P. E.; PRUVOST, O.; BOYER, K.; CHIROLEU, F.; CAO, T. T.; GAUDEUL, M.; BAIDER, C.; UTTERIDGE, T. M. A.; BECKER, N.; RIEUX, A.; GAGNEVIN, L. Herbarium specimen sequencing allows precise dating of *Xanthomonas citri* pv. *citrulli* diversification history. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 4306, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39950-z>
- CARLSON, C. J.; ALBERY, G. F.; MEROW, C.; TRISOS, C. H.; ZIPFEL, C. M.; ESKEW, E. A.; BANSAL, S. Climate change increases cross-species viral transmission risk. **Nature**, v. 607, n. 7919, p. 555-562, 2022.
- CASTILLO-HENRÍQUEZ, L.; ALFARO-AGUILAR, K.; UGALDE-ÁLVAREZ, J.; VEGA-FERNÁNDEZ, L.; OCA-VÁSQUEZ, G. M.; VEJA-BAUDRIT, J. R. Green synthesis of gold and silver nanoparticles from plant extracts and their possible applications as antimicrobial agents in the agricultural area. **Nanomaterials**, v. 10, n. 9, p. 1763, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano10091763>
- CHALUPOWICZ, L.; REUVEN, M.; DROR, O.; SELA, N.; BURDMAN, S.; MANULIS-SASSON, S. Characterization of *Acidovorax citrulli* strains isolated from solanaceous plants. **Plant Pathology**, v. 69, n. 9, p. 1787-1797, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13239>
- CHARIOU, P. L.; ORTEGA-RIVERA, O. A.; STEINMETZ, N. F. Nanocarriers for the delivery of medical, veterinary, and agricultural active ingredients. **Acs Nano**, v. 14, n. 3, p. 2678-2701, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c00173>
- CHAUHAN, P.; TAPWAL, A. Green synthesis of nanoparticles using botanicals and their application in management of fungal phytopathogens: a review. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 3, p. 94, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03431-0>
- CHEN, T.; QIAN, G. L.; YANG, X. L.; MA, J. Y.; HU, B. S.; LIU, F. Q. Detection of a quorum sensing signal molecule of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and its regulation of pathogenicity. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 49-53, 2009. DOI: [doi:10.1017/S1479236209002514](https://doi.org/10.1017/S1479236209002514)
- CONCEIÇÃO, C. S.; ASSUNÇÃO, E. F.; REZENDE, J. S.; MORAIS, R. F.; SILVA, A. M. F.; GAMA, M. A. S.; SOUZA, E. B. Ocorrência de mancha aquosa em melancia e meloeiro no estado do Piauí. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 50., 2017, Uberlândia. **Anais [...]**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2017.

CRAIG, L.; PIQUE, M. E.; TAINER, J. A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 363-378, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro885>

DARK, P.; GENT, H. Pests and diseases of prehistoric crops: a yield 'honeymoon' for early grain crops in Europe?. **Oxford Journal of Archaeology**, v. 20, n. 1, p. 59-78, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1111/1468-0092.00123>

DOUZI, B.; FILLOUX, A.; VOULHOX, R. On the path to uncover the bacterial type II secretion system. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 367, n. 1592, p. 1059-1072, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0204>

DU, J.; LIU, Y.; ZHU, H. Genome-based analyses of the genus *Acidovorax*: proposal of the two novel genera *Paracidovorax* gen. nov., *Paenacidovorax* gen. nov. and the reclassification of *Acidovorax antarcticus* as *Comamonas antarctica* comb. nov. and emended description of the genus *Acidovorax*. **Archives of Microbiology**, v. 205, n.1, p. 42, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03379-7>

DUAN, Q.; ZHOU, M.; ZHU, L.; ZHU, G. Flagella and bacterial pathogenicity. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 1-8, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/jobm.201100335>

DUDAS, G.; CARVALHO, M. L.; BEDFORD, T.; TATEM, A. J.; BAELE, G.; FARIA, N. R.; PARK, D. J.; LADNER, J. T.; ARIAS, A.; ASOGUN, D.; BIELEJEC, F.; CADDY, S. L.; COTTEN, M.; D'AMBROZIO, J.; DELLICOUR, S.; DI CARO, A.; DICLARO, J. W.; DURAFFOUR, S.; ELMORE, M. J.; FAKOLI, L. S.; FAYE, O.; GILBERT, M. L.; GEVAO, S. M.; ... RAMBAUR, A. Virus genomes reveal factors that spread and sustained the Ebola epidemic. **Nature**, v. 544, n. 7650, p. 309-315, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature22040>

ECKSHAIN-LEVI, N.; MUNITZ, T. ZIVANOVIC, M. TRAORE, S. M.; SPROER, C.; ZHAO, B. WELBAUM, G.; WALCOTT, R. SIKORSKI, J. BURDMAN, S. Comparative analysis of type III secreted effector genes reflects divergence of *Acidovorax citrulli* strains into three distinct lineages. **Phytopathology**, v. 104, n. 11, p. 1152-1162, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-13-0350-R>

ECKSHAIN-LEVI, N.; SHKEDY, D.; GERSHOVITS, M.; SILVA, G. M. TAMIR-ARIEL, D.; WALCOTT, R.; PUPKO, T.; BURDMAN, S. Insights from the genome sequence of *Acidovorax citrulli* M6, a group I strain of the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 430, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00430>

ELMER, W.; WHITE, J. C. The future of nanotechnology in plant pathology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, n. 1, p. 111-133, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050108>

EPPO. **European and mediterranean plant protection organization**. *Acidovorax citrulli*. Mini data sheet on *Acidovorax citrulli*. Disponível em: <<https://gd.eppo.int/taxon/PSDMAC/documents>>. Acesso em: 25 agost. 2024.

EPPO. **European and mediterranean plant protection organization**. Disponível em: <<https://gd.eppo.int/taxon/PSDMAC/distribution>>. Acesso em: 26 out. 2021.

FAN, H.; ZHANG, Z.; LI, Y.; ZHANG, X.; DUAN, Y.; WANG, Q. Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1973, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01973>

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization**. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>>. Acesso em: 26 agost. 2024.

FELLAHI, O.; SARMA, R. K.; DAS, R. M.; SAIKIA, R.; MARCON, L.; COFFINIER, Y.; HADJERSI, T.; MAAMACHE, M.; BOUKHERROUB, R. The antimicrobial effect of silicon nanowires decorated with silver

and copper nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 24, n. 49, p. 495101, 2013. DOI: 10.1088/0957-4484/24/49/495101

FENG, J. SCHUENZEL, E. L.; LI, J. SCHAAD, N. W. Multilocus sequence typing reveals two evolutionary lineages of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Phytopathology**, v. 99, n. 8, p. 913-920, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-8-0913>

FLEISCHMANN, R. D. *et al.* Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 496-512, 1995. DOI: 10.1126/science.7542800

GIBBS, A.; OHSHIMA, K. Potyviruses and the digital revolution. **Annual review of phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 205-223, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114404>

GIBBS, Adrian J. *et al.* The prehistory of potyviruses: their initial radiation was during the dawn of agriculture. **PloS One**, v. 3, n. 6, p. e2523, 2008.

GOSS, E. M. Genome-enabled analysis of plant-pathogen migration. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, n. 1, p. 1 DOI: 10.1146/annurev-phyto-080614-115936

GOSS, E. M.; TABIMA, J. F.; COOKE, D. E. L.; RESTREPO, S.; FRY, W. E.; FORBES, G. A.; FIELAND, V. J.; CARDENAS, M.; GRUNWALD, J. N. The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 24, p. 8791-8796, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1401884111

GUPTA, V. K., SHARMA, G. D., TUOHY, M. G., GAUR, R. (Eds.). **The handbook of microbial bioresources**. Wallingford: CAB International. p. 700, 2015.

GUSHULAK, B. D.; MACPHERSON, D. W. Population mobility and infectious diseases: the diminishing impact of classical infectious diseases and new approaches for the 21st century. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 3, p. 776-780, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1086/313998>

HOPKINS, D. L.; THOMPSON, C. M. Evaluation of *Citrullus* sp. germ plasm for resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Plant Disease**, v. 86, n. 1, p. 61-64, 2002a. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.1.61>

HORUZ, S. *Pseudomonas oryzihabitans*: a potential bacterial antagonist for the management of bacterial fruit blotch (*Acidovorax citrulli*) of cucurbits. **Journal of Plant Pathology**, v. 103, n. 3, p. 751-758, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00893-3>

HORUZ, S.; AYSAN, Y. Biological control of watermelon seedling blight caused by *Acidovorax citrulli* using antagonistic bacteria from the genera *Curtobacterium*, *Microbacterium* and *Pseudomonas*. **Plant Protection Science**, v. 54, n. 3, 2018. DOI: DOI:10.17221/168/2016-PPS

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/melao/br>>. Acesso em: 26 ago. 2024
ISAKEIT, T. Bacterial fruit blotch in watermelon. Texas: Texas AgriLife Extension Service, 1999.

ISAKEIT, T.; BLACK, M. C.; BARNES, L. W.; JONES, J. B. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Plant Disease**, v. 81, n. 6, p. 694-700, 1997. DOI: 10.1094/PDIS.1997.81.6.694C

ISLAM, M. R. HOSSAIN, M. R.; KIM, H. T.; NATH, U. K.; ABUYUSUF, M.; JUNG, H. J.; PARK, J. I.; NOU, I. S. Molecular characterization of *Acidovorax citrulli* strain NIHHS15-280 causing bacterial fruit blotch disease in Korea and screening of resistance sources in melon. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 61, n. 1, p. 115-126, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13580-019-00190-0>

- JIANG, Chun-Hao et al. Study on screening and antagonistic mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* 54 against bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Microbiological Research**, v. 170, p. 95-104, 2015.
- JIANG, Y.; ZHOU, P.; ZHANG, P.; ADEEL, M.; SHAKOOR, N.; LI, Y.; LI, M.; GUO, M.; ZHAO, W.; LOU, B.; WANG, L.; LYNCH, I.; RUI, Y. Green synthesis of metal-based nanoparticles for sustainable agriculture. **Environmental Pollution**, v. 309, p. 119755, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119755>
- JIMÉNEZ-GUERRERO, I.; PEREZ-MONTANO, F.; SILVA, G. M.; WAGNER, N. SHKEDY, D.; ZHAO, M.; PIZARRO, L.; BAR, M.; WALCOTT, R.; SESSA, G.; PUPKO, T.; BURDMAN, S. Show me your secret(ed) weapons: a multifaceted approach reveals a wide arsenal of type III-secreted effectors in the cucurbit pathogenic bacterium *Acidovorax citrulli* and novel effectors in the *Acidovorax* genus. **Molecular Plant Pathology**, v. 21, n. 1, p. 17-37, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12877>
- JOHNSON, K. L. **Elucidation of the host-pathogen interactions that influence seedto- seedling transmission of *Acidovorax citrulli***. 2010, 80 f. Tese (Doutorado) – University of Georgia, Athens, 2010.
- JONES, J. D.G; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- KANG, Y.; LIU, H.; GENIN, S.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 427-437, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03187.x>
- KARIM, N.; LIU, S.; RASHWAN, A.; XIE, J.; MO, J.; OSMAN, A. I.; ROONEY, D. W.; CHEN, W.. Green synthesis of nanolipo-fibersomes using Nutriose® FB 06 for delphinidin-3-O-sambubioside delivery: Characterization, physicochemical properties, and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 247, p. 125839, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125839>
- KNOWLES, L. L. Statistical phylogeography. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 40, n. 1, p. 593-612, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095702>
- KNOWLES, L. L.; MADDISON, W. P. Statistical phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 12, 2002.
- KOO, Y. M.; HEO, A. Y.; CHOI, H. W. Isolation and identification antagonistic bacterium *Paenibacillus tianmuensis* YM002 against *Acidovorax citrulli*. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1173695, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1173695>
- LEMEY, P.; RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A. Bayesian phylogeography finds its roots. **PLoS Computational biology**, v. 5, n. 9, p. e1000520, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000520>
- LI, Y.; HAO, G.; GALVANI, C. D.; MENG, Y.; DE LA FUENTE, L.; HOCH, H. C.; BURR, T. J. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell–cell aggregation. **Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 719-726, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/002311-0>
- LIJA, M.; BEEVY, S. S. A review on the diversity of melon. **Plant Science Today**, v. 8, n. 4, p. 995-1003, 2021. DOI: <https://doi.org/10.14719/pst.1300>
- LIU, W. LIU, J.; TRIPLETT, L.; LEACH, J. E. WANG, G. L. Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, p. 213- 241, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045926>
- MACNAB, R. M. How bacteria assemble flagella. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 77-100, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090832>

- MCCANN, H. C. Skirmish or war: the emergence of agricultural plant pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 56, p. 147-152, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.06.003>
- MCCARTHY, Y.; RYAN, R. P.; O'DONOVAN, K.; HE, Y. Q.; JIANG, B.L.; FENG, J.X.; TANG, J.L.; DOW, M. The role of PilZ domain proteins in the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 6, p. 819-824, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00495.x>
- MERCADO-MEZA, D. Y.; GUEVARA-GONZALEZ, R. G.; ESQUIVEL, K.; CARBAJAL-VALENZUELA, I.; AVILA-QUEZADA, G. D. Green silver nanoparticles display protection against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). **Plant Stress**, v. 10, p. 100256, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100256>
- MIRA, A.; PUSHKER, R.; RODRIGUEZ-VALERA, F. The Neolithic revolution of bacterial genomes. **Trends in microbiology**, v. 14, n. 5, p. 200-206, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.03.001>
- MOHAMMAD, Z. H.; AHMAD, F.; IBRAHIM, S. A.; ZAIDI, S. Application of nanotechnology in different aspects of the food industry. **Discover Food**, v. 2, n. 1, p. 12, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s44187-022-00013-9>
- MOHAMMADI, G.; NOKHODCHI, A.; BARZEGAR-JALALI, M.; LOTFIPOUR, F.; ADIBKIA, K.; EHYAEI, N.; VALIZADEH, H. Physicochemical and anti-bacterial performance characterization of clarithromycin nanoparticles as colloidal drug delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 39-44, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.05.050>
- MONGA, Y.; KUMAR, P.; SHARMA, R. K.; FILIP, J.; VARMA, R. S.; ZBORIL, R.; GAWANDE, M. B. Sustainable synthesis of nanoscale zerovalent iron particles for environmental remediation. **ChemSusChem**, v. 13, n. 13, p. 3288-3305, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/cssc.202000290>
- MONJANE, A. L.; HARKINS, G. W.; MARTIN, D. P.; LEMEY, P.; LEFEUVRE, P.; SHEPHERD, D. N.; OLUWAFEMI, S.; VARSANI, A. Reconstructing the history of maize streak virus strain a dispersal to reveal diversification hot spots and its origin in southern Africa. **Journal of Virology**, v. 85, n. 18, p. 9623-9636, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.00640-11>
- MOURA, M. C. F.; AZEVEDO, S. G.; OLIVEIRA, L. C. S.; SANTOS, E. C. Avidades impactantes da cadeia produtiva do melão no agropólo Mossoró/Assú-RN. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 7, p. 1-6, 2012.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 51, p. 263-273, 1986. DOI: [doi:10.1101/SQB.1986.051.01.032](https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032)
- MUTHURAMALINGAM, R.; BARROSO, K.; MILAGRES, J.; TEDARDI, V.; FRANCO, F. O.; TAKESHITA, V.; KARMOUS, I.; EL-TANBOULY, R.; DA SILVA, W. Tiny but Mighty: Nanoscale Materials in Plant Disease Management. **Plant Disease**, v. 108, n. 2, p. 241-255, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1094/pdis-05-23-0970-fe>
- NASCIMENTO, P. G. M. L.; AMBROSIO, M. M. Q.; FREITAS, F. C. L.; CRUZ, B. L. S.; DANTAS, A. M. M.; JÚNIOR, R. S.; SILVA, W. L. Incidence of root rot of muskmelon in different soil management practices. **European Journal of Plant Pathology**, v. 152, p. 433-446, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1488-6>
- NUDLEMAN, E.; KAISER, D. Pulling together with type IV pili. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 52-62, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1159/000077869>
- OGUNYEMI, S. O. FANG, Y.; QIU, W.; LI, B.; CHEN, J.; YANG, M.; HONG, X.; LOU, J.; WANG, Y.; SUN, G. Role of type IV secretion system genes in virulence of rice bacterial brown stripe pathogen *Acidovorax*

oryzae strain RS-2. **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 343-350, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.017>

OLIVEIRA, A.; SANTOS, M. H. M.; SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R. Biocontrole da mancha aquosa do meloeiro pelo tratamento de sementes com bactérias epifíticas e endolíticas. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 3, p. 373-377, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362006000300021>

OSMAN, A.; ZHANG, Y.; FARGHALI, M.; RASHWAN, A. K.; ELTAWAIL, A. S.; EL-MONAEM, E. M. A.; MOHAMED, I. M. A.; BADR, M. M.; IHARA, I.; ROONEY, D. W.; YAP, P. S. Synthesis of green nanoparticles for energy, biomedical, environmental, agricultural, and food applications: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 22, n. 2, p. 841-887, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-023-01682-3>

PEREZ-QUINTERO, A. L.; ORTIZ-CASTRO, M.; LANG, J. M.; RIEUX, A.; WU, G.; LIU, S.; CHAPMAN, T. A.; CHANG, C.; ZIEGLE, J.; PENG, Z.; WHITE, F. F.; PLAZAS, M. C.; LEACH, J. E.; BRODERS, K. Genomic acquisitions in emerging populations of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* infecting corn in the United States and Argentina. **Phytopathology**, v. 110, n. 6, p. 1161-1173, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-19-0077-R>

PITRAT, M. Melon genetic resources: phenotypic diversity and horticultural taxonomy. **Genetics and Genomics of Cucurbitaceae**, p. 25-60, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/7397_2016_10

PRESTON, H. A. F.; NASCIMENTO, C. W. A.; PRESTON, W.; NUNES, G. H. S.; LOUREIRO, F. L. C.; MARIANO, R. L. R. Silicon slag increases melon growth and resistance to bacterial fruit blotch. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 43, n. 6, p. 1-11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v43i1.45075>

RAHIMI-MIDANI, A.; CHOI, T. J. Transport of phage in melon plants and inhibition of progression of bacterial fruit blotch. **Viruses**, v. 12, n. 4, p. 477, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12040477>

RASHWAN, A. K.; BAI, H.; OSMAN, A. I.; ELTOHAMY, K. M.; CHEN, Z.; YOUNIS, H. A.; AL-FATESH, A.; ROONEY, D. W.; YAP, P. S. Recycling food and agriculture by-products to mitigate climate change: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 21, n. 6, p. 3351-3375, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-023-01639-6>

RASMUSSEN, D. A.; GRÜNWALD, N. J. Phylogeographic approaches to characterize the emergence of plant pathogens. **Phytopathology**, v. 111, n. 1, p. 68-77, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0319-FI>

ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAN, L.O.S. Podridão de frutas do melão em pós-colheita, causadas por bactérias no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, n.2, p.195, 1992. Resumo.

ROINE, E. RAINERI, D. M.; ROMANTSCHUK, M.; WILSON, M.; NUNN, D. N. Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, n. 11, p. 1048-1056, 1998.

ROSENBERG, T.; ECKSHAIN-LEVI, N.; BURDMAN, S. Plant pathogenic *Acidovorax* species. In: MURILLO, J.; JACKSON, R.W.; VINATZER, B.; ARNOLD, D. L. (Eds.) **Bacteria-plant interactions: Advanced research and future trends**. Caister Academic Press, 2015. P. 83-100.

ROSENBERG, T.; SALAM, B. B.; BURDMAN, S. Association between loss of type IV pilus synthesis ability and phenotypic variation in the cucurbit pathogenic bacterium *Acidovorax citrulli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 31, n. 5, p. 548-559, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-17-0324-R>

SALES JÚNIOR, R.; SENHOR, R. F.; MICHERFF, S. J.; NEGREIROS, A. M. P. Reaction of melon genotypes to the root's rot caused by *Monosporascus*. **Revista Caatinga**, v. 32, p. 288-294, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-21252019v32n130rc>

- SALES JÚNIOR, R.; SOARES, S. P. F.; FILHO, J. A.; NUNES, G. H. S.; MIRANDA, V. S. Qualidade do melão exportado pelo porto de Natal. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 98-100, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362004000100020>
- SANGER, F.; AIR, G. M.; BARRELL, B. G.; BROWN, N. L.; COULSON, A. R.; FIDDES, J. C.; HOTCHISON III, C. A.; SLOCOMBE, P. M.; SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. **Nature**, v. 265, n. 5596, p. 687-695, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1038/265687a0>
- SANTIAGO, T. R.; BONATTO, C. C.; ROSSATO, M.; LOPES, C. A. P.; LOPES, C. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; SILVA, L. P. 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**, v. 99, n. 9, p. 4248-4259, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9656>
- SAVARY, S.; WILLOCQUET, L.; PETHYBRIDGE, S. J.; ESKER, P.; McROBERTS, N.; NELSON, A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature ecology & evolution**, v. 3, n. 3, p. 430-439, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- SCHAAD, N. W. POSTNIKOVA, E.; SECHLER, A.; CLAFLIN, L. E.; VIDAVER.; JONES, J. B., AGARKOVA, I.; IGNATOV, A.; DICKSTEIN, E.; RAMUNDO, B. A. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. Avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, n. 6-8, p. 434-446, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.09.003>
- SEIL, J. T.; WEBSTER, T. J. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. **International Journal of Nanomedicine**, p. 2767-2781, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S24805>
- SEKHON, B. S. Nanotechnology in agri-food production: an overview. **Nanotechnology, Science and Applications**, p. 31-53, 2014. <https://doi.org/10.2147/NSA.S39406>
- SHANMUGAM, C.; GUNASEKARAN, D.; DURAISAMY, N.; NAGAPPAN, R. Bioactive bile salt-capped silver nanoparticles activity against destructive plant pathogenic fungi through in vitro system. **RSC Advances**, v. 5, n. 87, p. 71174-71182, 2015. DOI: [doi:10.1039/c5ra13306h](https://doi.org/10.1039/c5ra13306h)
- SHIDORE, T.; ZUVERZA-MENA, N.; WHITE, J. C.; SILVA, W. Nanoenabled delivery of RNA molecules for prolonged antiviral protection in crop plants: a review. **ACS Applied Nano Materials**, v. 4, n. 12, p. 12891-12904, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c03512>
- SILVA, G. M.; SOUZA, R. M.; YAN, L.; JUNIOR, R. S.; MEDEIROS, F. H. V.; WALCOTT, R. Strains of the group I lineage of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbitaceous crops, are predominant in Brazil. **Phytopathology**, v. 106, n. 12, p. 1486-1494, 2016a. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-16-0205-R>
- SILVA, K. M. M.; XAVIER, A. S.; GAMA, M. A. S.; LIMA, N. B.; LYRA, M. C. C. P.; MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. Polyphasic analysis of *Acidovorax citrulli* strains from northeastern Brazil. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 3, p. 252-259, 2016b.
- SIMPSON, A.; REINACH, F.; ARRUDA, P. ABREU, F. A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L. M. C.; ARAYA, J. E.; BAIA, G. S.; BARROS, M. H.; BONACCORSI, E. D.; BORDIN, S.; SETUBAL, J. C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406, n. 6792, p. 151-157, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/35018003>
- STUKENBROCK, E. H.; BANKE, SOREN, B.; JAVAN-NIKKHAH, M.; MCDONALD, B. A. Origin and domestication of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* via sympatric speciation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 2, p. 398-411, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msl169>

STUKENBROCK, E. H.; MCDONALD, B. A. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, n. 1, p. 75-100, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.010708.154114>

TAGUCHI, F.; ICHINOSE, Y. Role of type IV pili in virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605: correlation of motility, multidrug resistance, and HR-inducing activity on a nonhost plant. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 9, p. 1001-1011, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-11-0026>

TAMPAKAKI, A. P.; SKANDALIS, N.; GAZI, A. D.; BASTAKI, M. N. SARRIS, P. F.; CHAROVA, S. N.; KOKKINIDIS, M. PANOPOULOS, N. J. Playing the “Harp”: evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 347-370, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114407>

TIAN, Y.; LUO, J.; WANG, H.; ZAKI, H. E. M.; YU, S.; WANG, X.; AHMED, T.; SHAHID, M. S.; YAN, C.; CHEN, J.; LI, B. Bioinspired green synthesis of silver nanoparticles using three plant extracts and their antibacterial activity against rice bacterial leaf blight pathogen *xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Plants**, v. 11, n. 21, p. 2892, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11212892>

TIAN, Y.; ZHAO, Y.; WU, X.; LIU, F.; HU, B.; WALCOTT, R. R. The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 1, p. 38- 47, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12159>

TROVÃO, N. S.; BAELE, G.; VRANCKEN, B.; BIELEJEC, F.; SUCHARD, M. A.; FARGETTE, D.; LEMEY, P. Host ecology determines the dispersal patterns of a plant virus. **Virus Evolution**, v. 1, n. 1, p. vev016, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/ve/vev016>

VILGIS, S.; DEIGNER, H. P. Sequencing in Precision Medicine. In: DEIGNER, H. P.; KOHL, K. (Eds) **Precision Medicine**. 1st ed. Amsterdam, Academic Press, 2018, p. 79 – 101. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805364-5.00005-6>

VON BODMAN, S. B.; BAUER, W. D.; COPLIN, D. L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, n. 1, p. 455-482, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095652>

WALCOTT, R. R.; FESSEHAIE, A.; CASTRO, A. C. Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit host. **Journal of Phytopathology**, v. 152, n. 5, p. 277-285, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00841.x>

WALCOTT, R. R.; LANGSTON, D. B.; SANDERS, F. H.; GITAITIS, R. D. Investigating intraspecific variation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using DNA fingerprinting and whole cell fatty acid analysis. **Phytopathology**, v. 90, n. 2, p. 191-196, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.2.191>

WANG, L.; MAKINO, S.; SUBEDEE, A.; BOGDANOVE, A. J. Novel candidate virulence factors in rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* as revealed by mutational analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 24, p. 8023-8027, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01414-07>

WANG, T.; GUAN, W.; HUANG, Q.; YANG, Y.; YAN, W.; SUN, B.; ZHAO, T. Quorum-sensing contributes to virulence, twitching motility, seed attachment and biofilm formation in the wild type strain Aac-5 of *Acidovorax citrulli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 133-140, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.039>

WEBB, R. E. GOTH, R. W. A seedborne bacterium isolated from watermelon. **Plant Disease Reporter**, v. 49, p. 818-21, 1965.

WEBER, B.; HASIC, M.; CHEN, C.; WAI, S.N.; MILTON, D. L. Type VI secretion modulates quorum sensing and stress response in *Vibrio anguillarum*. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 3018-3028, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02005.x>

- WECHTER, W. P.; LEVI, A.; LING, K. S.; KOUSIK, C.; BLOCK, C. C. Identification of resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* among melon (*Cucumis* spp.) plant introduction. **HortScience**, v. 46, n. 2, p. 207-212, 2011. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.2.207>
- WILLEMS, A. GOOR, M.; THIELEMANS, S.; GILIS, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 107-119, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-42-1-107>
- WORRALL, E. A.; HAMID, A.; MODY, K. T.; MITTER, N.; PAPPU, H. R. Nanotechnology for plant disease management. **Agronomy**, v. 8, n. 12, p. 285, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy8120285>
- XU, J.; WANG, N. Where are we going with genomics in plant pathogenic bacteria? **Genomics**, v. 111, n. 4, p. 729-736, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.04.011>
- XU, Y.; RASHWAN, A. K.; OSMAN, A. I.; EL-MONAEM, E. M. A.; ELGARAHY, A. M.; ELTAWAIL, A. S.; OMAR, M.; LI, Y.; MEHANNI, A. H. E.; CHEN, W.; ROONEY, D. W. Synthesis and potential applications of cyclodextrin-based metal-organic frameworks: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 21, n. 1, p. 447-477, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-022-01509-7>
- YAN, L. HU, B.; CHEN, G.; ZHAO, M.; WALCOTT, R. R. Further evidence of cucurbit host specificity among *Acidovorax citrulli* groups based on a detached melon fruit pathogenicity assay. **Phytopathology**, v. 107, n. 11, p. 1305-1311, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-16-0416-R>
- YANG, L.; ZHAO, M.; ZHANG, X.; JIANG, J.; FEI, N.; JI, W.; YE, Y.; GUAN, W.; YANG, Y.; ZHAO, T. *Acidovorax citrulli* type III effector AopU interferes with plant immune responses and interacts with a watermelon E3 ubiquitin ligase. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1275032, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1275032>
- YANG, R.; GARCIA, D. S.; PÉREZ, F.M.; SILVA, G. M.; ZHAO, M.; JIMÉNEZ GUERREO, I.; ROSENBERG, T.; CHEN, G.; PLASCHKES, I.; MORIN, S.; WALCOTT, R.; BURDMAN, S.; Complete assembly of the genome of an *Acidovorax citrulli* strain reveals a naturally occurring plasmid in this species. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1400, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01400>
- YANG, Y.; FEI, N.; JI, W.; QIAO, P.; YANG, L.; LIU, D.; GUAN, W.; ZHAO, T. *pilA* gene contributes to virulence, motility, biofilm formation, and interspecific competition of bacteria in *Acidovorax citrulli*. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1806, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071806>
- YANG, Y.; JI, W.; QIAO, P.; FEI, N.; YANG, L.; GUAN, W.; ZHAO, T. *Acidovorax citrulli* Type IV Pili PilR Interacts with PilS and Regulates the Expression of the *pilA* Gene. **Horticulturae**, v. 9, n. 12, p. 1296, 2023.
- ZHANG, X. ZHAO, M. YAN, J.; YANG, L.; YANG, Y.; GUAN, W.; WALCOTT, R.; ZHAO, T. Involvement of *hrpX* and *hrpG* in the virulence of *Acidovorax citrulli* strain Aac5, causal agent of bacterial fruit blotch in cucurbits. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 507, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00507>
- ZHAO, M. DUTTA, B.; LUO, X.; BURDMAN, S.; WALCOTT, R. Genetically distinct *Acidovorax citrulli* strains display cucurbit fruit preference under field conditions. **Phytopathology**, v. 110, n. 5, p. 973-980, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-19-0389-R>
- ZHAO, M.; PIZARRO, L.; BAR, M.; WALCOTT, R.; SESSA, G.; PUPKO, T.; BURDMAN, S. Show me your secret(ed) weapons: a multifaceted approach reveals a wide arsenal of type III-secreted effectors in the cucurbit pathogenic bacterium *Acidovorax citrulli* and novel effectors in the *Acidovorax* genus. **Molecular Plant Pathology**, v. 21, n. 1, p. 17-37, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12877>

ZHAO, M.; WALCOTT, R. R. *Acidovorax citrulli*: history, epidemiology, and management of bacterial fruit blotch of cucurbits. In: BURDMAN, S.; WALCOTT, R. R. **Plant-pathogenic *Acidovorax* species**. St. Paul: **The American Phytopathological Society (APS)** 2018. p. 39-57.

ZIVANOVIC, M.; WALCOTT, R. R. Further characterization of genetically distinct groups of *Acidovorax citrulli* strains. **Phytopathology**, v. 107, n. 1, p. 29-35, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-16-0245-R>

ZOLGHADR, B.; KLINGL, A.; KOERDT, A.; DRIESSEN, A. J. M.; RACHEL, R.; ALBERS, S. V. Appendage-mediated surface adherence of *Sulfolobus solfataricus*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 1, p. 104-110, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.01061-09>

CAPÍTULO II

Phylogenomic analysis of *Paracidovorax citrulli* strains reveals the presence of two lineages in Brazil

Phylogenomic analysis of *Paracidovorax citrulli* strains reveals the presence of two lineages in Brazil

David F. Duarte¹, Lucas P. Lucena¹, Marcelo Henrique Oliveira Gonçalves², Ana M. Benko-Iseppon³, Flávia Aburjaile⁴, Vasco Azevedo⁵, Bertram Brenig⁶, Marco Aurélio S. Gama¹, Elineide B. Souza⁷

¹*Department of Agronomy, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brazil*

²*Department of Phytopathology, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, MG, Brazil*

³*Department of Genetics, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil*

⁴*Department of Preventive Veterinary Medicine, Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil*

⁵*Department of Genetics, Ecology, and Evolution, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil*

⁶*Department of Molecular Biology of Livestock, Institute of Veterinary Medicine, Georg August University, 37077, Göttingen, Germany*

⁷*Department of Biology, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brazil*

Running title: Genomic characterization of Brazilian strains of *Paracidovorax citrulli* reveals predominance of groups I strains

Key words: Bacterial fruit blotch, melon, pan-genome, phylogenomic

Corresponding Author: Elineide Barbosa de Souza. Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, AV. D. Manoel de Medeiros, s/n Dois Irmãos, 52171-900, Recife – PE, Brazil. E-mail: elineide.souza@ufrpe.br. ORCID ID. 0000-0003-1281-3490.

Abstract

Paracidovorax citrulli is the causative agent of bacterial fruit blotch in melons and watermelons. Based on biochemical and genetic analyses, the strains of this species are divided into two genetically distinct groups (groups I and II). This study used comparative genomic approaches of 17 Brazilian *P. citrulli* strains obtained from melons and watermelons to classify them into groups I and II and try to understand their genomic differences. The genomes of *P. citrulli* presented general characteristics similar to those shown for the genomes of the type

strain of *P. citrulli* and reference strains of groups I and II. A phylogenomic analysis revealed two distinct groups of *P. citrulli*, in which most Brazilian *P. citrulli* strains were grouped with the strain representing group I. Crispr-cas analysis revealed the presence of two proteins, cas3 and cas10, in all Brazilian *P. citrulli* genomes. In addition, we observed the presence of two plasmids (pAMC6 and pAC53) in three Brazilian *P. citrulli* strains, all closely related to group I. The prediction of effector proteins revealed the XopE/AvrPphe protein as a differential between the strains of groups I and II. The present study will contribute to a more detailed understanding of aspects of host-pathogen interactions and will help improve the detection of strains from these groups, thus elucidating the population dynamics of Brazilian strains of *P. citrulli*.

Introduction

Bacterial fruit blotch, caused by the Gram-negative bacterium *Paracidovorax citrulli* (formerly *Acidovorax citrulli*) (Du *et al.*, 2022), is a disease with high destructive potential that threatens the global production of cucurbits (mainly melon and watermelon) for more than 50 years, since its first detection in watermelon in the United States in 1965 (Webb and Goth, 1995; Tian *et al.*, 2020). In Brazil, bacterial fruit blotch was first reported of economic impact in 1997, in commercial melon fields located in the state of Rio Grande do Norte (Assis *et al.*, 1999) and is currently distributed in eight other states (Bahia, Ceará, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Sul, Roraima, and São Paulo) (Assunção *et al.*, 2021; EPPO, 2023). In addition, bacterial fruit blotch has also been reported in watermelon crops in Brazil (Macagnan *et al.*, 2003; Halfeld-Vieira and Nechet, 2007), though it has not caused significant economic impact on production (Carvalho *et al.*, 2013).

The disease can occur at different stages of melon crop. On cotyledonary and true leaves, symptoms start as oily spots and progress to necrotic spots (Oliveira *et al.*, 2006; Wechter *et al.*, 2011). Symptoms on fruits are characterized by small oily spots that expand and become brown. Internally, dry rot develops as a result of bacterial colonization of the pulp (Melo *et al.*, 2015). Therefore, given that these symptoms make fruit commercialization infeasible (Assunção *et al.*, 2021), the efficient management of bacterial fruit blotch in melon crops requires a set of control measures across three production stages: seeds, seedlings, fruits and adult plants (Assunção *et al.*, 2021).

Paracidovorax citrulli strains show extensive intraspecies genetic diversity (Yang *et al.*, 2023). This species is divided into two distinct groups based on variations in aggressiveness and host preference (Walcott *et al.*, 2004). Group I strains have been primarily isolated from

non-watermelon cucurbits and demonstrate moderate to high aggressiveness on several cucurbits, including melon and watermelon, while group II strains have been isolated from watermelon and are more aggressive on this host than other cucurbits (Yan *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2022). Strains of *P. citrulli* groups I and II can also be distinguished by their effector proteins, which play crucial roles in determining their host preferences (Eckshtain-Levi *et al.*, 2014). Furthermore, there may be other substantial genomic differences between group I and group II strains, as the complete genomic sequence of a representative group I strain (M6) is approximately 500kbp smaller compared to that of a representative group II strain (AAC00-1) (Eckshtain-Levi *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2022).

Studies with Brazilian strains of *P. citrulli* using PFGE, MLSA of housekeeping and virulence-associated genes, rep-PCR, and pathogenicity tests on seedlings of different cucurbit species revealed the predominance of group I strains (Silva *et al.*, 2016a, b). However, the genomic sequencing of Brazilian strains remains to be carried out. Therefore, we performed the genomic sequencing of 17 *P. citrulli* strains obtained from melon and watermelon fruit in Brazil. The main goal was to classify them within groups I and II and characterize the genomic differences between them using various methods, including average nucleotide identity (ANI) and DNA-DNA hybridization (*d*DDH) values, pan-genomics, phylogenomic, Crispr-*cas* analysis, plasmid detection, and analysis of type III and IV secretion system effector protein.

Material and Methods

Strains, growth conditions, and DNA extraction

Sixteen strains (CCRM_{Ac}8, CCRM_{Ac}9, CCRM_{Ac}12, CCRM_{Ac}1.12, CCRM_{Ac}1.43, CCRM_{Ac}1.45, CCRM_{Ac}1.73, CCRM_{Ac}1.78, CCRM_{Ac}1.83, CCRM_{Ac}5.1, CCRM_{Ac}5.3, CCRM_{Ac}5.28, CCRM_{Ac}MP2, CCRM_{Ac}R2, IBSBF1214, IBSBF1521) and one strain (IBSBF1627) of *P. citrulli* obtained from melon and watermelon fruits in Brazil, respectively, were used in this study. These strains belong to a collection) of 40 strains and were selected based on pathological on seedlings and melon fruits, biochemical, molecular, and phylogenetic variability (Silva *et al.*, 2016b). All these strains are deposited in the Phytobacteria Culture Collection from the Laboratory of Phytobacteriology of the Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

All strains were grown in nutrient yeast dextrose agar (NYDA, 10 g dextrose, 5 g peptone, 5 g yeast extract, 3 g meat extract, and 20 g agar, completing the volume with distilled water to 1,000 ml) and incubated for 36 hours at 29 °C. DNA extraction from the strains was performed using the DNA MiniPrep bacterial extraction kit (Axygen Biosciences, MA),

following the manufacturer's recommendations. The DNA concentration was adjusted to 10 ng μl^{-1} using a Biodrop (BiodropTM, Cambridge, Canada).

Whole-genome DNA sequencing, assembly, and annotation

The libraries were assembled according to the manufacturer and genome sequencing was performed on the Illumina Hiseq 2500 platform (San Diego, CA, USA), resulting in paired-end libraries with 150-bp reads. The quality of the reads was assessed using the FastQC software (Andrews, 2010). When necessary, sequencing adapters were removed from the reads and the sequences were subsequently trimmed to exclude portions with lower quality using Trimmomatic v. 0.32 (Bolger *et al.*, 2014). The genomes were assembled using the *de novo* method using the SPAdes-V3.15.3 software (Bankevich *et al.*, 2012). To evaluate the quality of the assemblies, the Quast v.5.0.2 software was used (Gurevich *et al.*, 2013). Automatic genome annotation was performed using Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) software.

Taxogenomic and phylogenomic analysis

The genomes of the Brazilian strains of *P. citrulli* were compared with the genomes of the types strains of species of the genus *Paracidovorax* and with genomes of 22 strains of *P. citrulli*, including those representing groups I (M6) and II (AAC00-1) (Table S1), which were downloaded from the Genbank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). For general calculations of genome relatedness indices, the average nucleotide identity was calculated using Pyani v.0.2.11 (Pritchard *et al.*, 2015), and DNA-DNA hybridization (*d*DDH) between genomes was calculated using the genome-to-genome distance calculator version 3.0 online service, applying the recommended formula (formula 2) (Meier-Kolthoff *et al.*, 2022). The genomes of the strains under study were analyzed together with genomes of the type strain of the *Paracidovorax* species to obtain orthologous genes using the Roary software (Version 3.13.0) (Page *et al.*, 2015). Gene alignment was carried out using MAFFT 7.487 (Katoh and Standley, 2013). Later, IQ-TREE (Trifinopoulos *et al.*, 2016) and iTOL software (Letunic and Bork, 2021) were used to obtain a Maximum Likelihood (ML) phylogenomic tree.

Crispr-Cas, Presence of plasmids, and Type III and Type IV Secretion System Analyses

The genomes of the Brazilian strains *P. citrilli* were also analyzed to find clustered regularly interspersed palindromic repeats (CRISPR) and associated proteins (Cas) using the online tool CRISPRone. Furthermore, the presence of plasmids in the genomes and effector

proteins of the type III and IV secretion system was evaluated using the MOB-Recon (Robertson and Nash. 2018) and T3Sepp (Hui *et al.*, 2020) software, respectively.

Results

Whole-genome DNA sequencing, assembly, and annotation

The analyzes performed with the 17 genomic sequences of the Brazilian strains of *P. citrulli* showed values for genome size, number of coding sequences, and N50 ranged from 4,714,945 bp (CCRMaC1.12) to 5,134,657 bp (IBSBF1627), 4,472 (CCRMaC1.12) to 5,022 (IBSBF1627), and 84,151 (IBSBF1627) to 170,687 (CCRMaC5.3), respectively (Table 1). CG content ranged from 68.9% (IBSBF1627) to 69% (CCRMaC1.12), and the RNA number varied between 49 (IBSBF1214) and 51 (CCRMaC2 and IBSBF1627). Furthermore, the genomes exhibited different values in the number of contigs, which ranged from 65 (CCRMaC5.3) and 127 (IBSBF1627).

Taxogenomic and phylogenomic analysis

The results of the ANI and *d*DDH analyzes demonstrated that values among the genomes of the Brazilian strains of *P. citrulli* ranged from 99.6% (IBSBF1627) to 99.9% (CCRMaC1.12) and 97.5% (IBSBF1627) to 100% (CCRMaC1.12), respectively (Supplementary Table S1). ANI and *d*DDH values above 99.6% and 96.7%, respectively, were observed among the genomes of the strains sequenced in this study and the genome of the type strain of *P. citrulli* (DMS 17060^T), showing that the analyzed strains belong to this species. Pan-genomic analysis of the genomes of *Paracidovorax* species revealed 87 core genes, 4651 shell genes, and 29251 cloud genes. The phylogenomic ML tree built with the core genome showed that all Brazilian strains were grouped into a single cluster along with DMS 17060^T (Figure 1A).

The ANI and *d*DDH values observed among the genomes of Brazilian strains and genomes of 22 strains of *P. citrulli* available in GenBank ranged from 99.3% (*P. citrulli* EP) to 99.9% (CCRMaC1.43) and 93.1% (*P. citrulli* EP) to 100% (CCRMaC5.1), respectively (Supplementary Table S2). When we analyzed only the Brazilian strains, we can verify that the ANIm and *d*DDH values observed among the genomes of the Brazilian strains of *P. citrulli* varied between 99.6% (IBSBF1627) to 99.9% (CCRMaC1.12), and 97.5% (IBSBF1627) to 100% (CCRMaC1.12), respectively. When we compared the genomes of the Brazilian strains with the group I (M6) and II (AAC00-1) strains, ANIm and *d*DDH values among Brazilian strains and the M6 strain ranged from 99.6% (IBSBF1627) to 99.9% (CCRMaC12) and from

97.5% (IBSBF1627) to 99.9% (CCRMAC12), respectively. In comparison, the values among Brazilian strains and AAC00-1 strain ranged from 99.6% (CCRMAC12) to 99.9% (IBSBF1627) for ANIm and 97.4% (CCRMAC1.83) to 99.9% (IBSBF1627) for *d*DDH.

The pan-genomics conducted on the Brazilian *P. citrulli* strains, along with strains obtained from GenBank, identified 1399 core genes, 2936 shell genes, and 11795 cloud genes. The phylogenomic ML tree built with the core genes (1399) grouped 16 Brazilian strains of *P. citrulli* along with DMS 17060^T, M6, and other eight strains (HPP21-3-3B, HPP21-9-4B, NWBSC196, pslb65, ZJU1106, NWBSC107, KACC17001, tw6), while only one Brazilian strain (IBSBF1627) was grouped along with AAC00-1 and others 12 strains obtained from GenBank (Figure 1B).

Crispr-Cas, Presence of plasmids, and Type III and Type IV Secretion System Analyses

Analysis of the CRISPR-*cas* system revealed *cas* proteins. All strains in the present study presented *cas3* and *cas10* proteins, which are included in class I. In addition to the proteins aforementioned, we also observed in all strains the presence of the *csa3*, *csa5gr11*, *DEDDh*, and *Ding* genes (Figure 2).

The plasmids pACM6 and pAC53 were detected in the genomes of only three of the 17 strains sequenced in this study (Table 2). Plasmid pACM6 was identified in strains CCRMAC9 and IBSBF1521, while plasmid pAC53 was present in strains CCRMAC8, CCRMAC9 and IBSBF1521 (strains belonging to group I). The predicted plasmids showed GC content ranging from 60.63 (CCRMAC8) to 61.25% (IBSBF1521). The visualization of pACM6 alongside the chromosomal genome revealed varying plasmid fragments across the strains examined in this study (Figure 3). The predicted number of effector proteins of the type III secretion system varied from 25 (CCRMAC1.43) to 34 (CCRMACMP2 and IBSBF1214). In turn, the number of type IV secretion system proteins ranged from 62 (CCRMAC1.12) to 70 (IBSBF1627). The effector protein XopE/AvrPphe, which belongs to family type III secretion system effector, was predicted in all Brazilian strains belonging to group I, and absent in the Brazilian strain belonging to group II (IBSBF1627). In addition, the description of type III and type IV effector proteins predicted in the genomes of these strains is listed in Supplementary Table S3.

Discussion

Seventeen strains of *P. citrulli* obtained from melon (*n* = 16) and watermelon (*n* = 1) fruits with symptoms of bacterial fruit blotch in Brazil were selected to carry out a genomic characterization aiming to detect genomic differences among strains of the groups I and II to

understand in more detail aspects of the pathogen-host interaction and help to improve the detection of the strains of these groups.

The ANI and dDDH values obtained for the 17 Brazilian strains, in comparison with the type strain of *P. citrulli* (DSM17060^T), corroborate the parameters previously established for species determination. Thus, given that the criterion established for bacterial species determination is 70% for dDDH and 95% for ANI (Goris *et al.*, 2007; Richter and Rosselló-Móra, 2009), these results confirm all strains as *P. citrulli*. In addition, the phylogenomic analysis performed here demonstrated that all Brazilian strains were closely related to DMS 17060^T, as they were all grouped into a single clade with bootstrap 1000 (Figure 1A). Using rep-PCR, Melo *et al.* (2014) verified that the Brazilian strains were closely related to the type strain of *P. citrulli*, which was designated as group I. Similar results were also observed by Silva *et al.* (2016b).

The values found in our study closely aligned with those observed for the genomes of the type strain (DSM 17060^T) and reference strains of groups I (M6) and II (AAC00-1) of *P. citrulli* available in GenBank, which had genome sizes of 4,848,266 bp, 4,899,546 bp, and 5,352,772 bp, respectively, and a coding sequence number of 4,678, 4,644, and 5,174. Evolutionary evidence that separates strains of both groups lies in the presence of eight DNA fragments found in the genome of the strain AAC00-1 (group II reference strain), which are absent in the M6 genome (group I reference strain) (Eckshtain-Levi *et al.*, 2016). In the present study, we found that the genome of strain IBSBF1627 is approximately 500 kb larger than those of the other Brazilian strains (Table 1). Furthermore, it was the only strain grouped along with AAC00-1 (group II). The ANI and dDDH analyses did not present borderline values that allowed the separation of *P. citrulli* groups. However, there was a trend regarding ANI and dDDH values; strains within the same group have higher ANI and dDDH values, while strains from different groups have lower ANI and dDDH values.

The phylogenetic ML tree constructed with the core genes (cMLSA) divided the strains of *P. citrulli* into two distinct groups, in which the majority of them, including 16 Brazilian strains, clustered together with the type strain DMS 17060^T, as well as M6 and others strains (HPP21-3-3B, HPP21-9-4B, NWBSC196, NWBSC107, pslb65, ZJU1106, KACC17001, tw6), with a bootstrap of 1000% (Figure 1B), demonstrating that all of them belong to Group I *sensu* Walcott *et al.* (2000; 2004) and confirming the predominance of *P. citrulli* group I strains in Brazil, as previously described (Silva *et al.*, 2016a; b). According to Zlatković *et al.* (2022), the strains ZJU1106 and pslb65 (also present in our study) clustered with the reference strain of group I (M6) and the type strain, thus corroborating the results of the present study. The strain

IBSBF1627 was grouped along with AAC00-1 (group II), EP, T1, KACC18784, NWBSC074, KACC18782, AAC00-1 #5593, AAC00-1 #5596, AAC00-1 #5684, KACC17005, KACC17005_2 and KACC17913. Based on the analysis of the partial 23S rDNA sequence, strain IBSBF1627 was classified belonging to as group I (Silva *et al.*, 2016b), but in the analysis carried out, strains representative of the two groups were not used.

Currently, several *Crispr-cas* mechanisms are found in prokaryotes, which are categorized into two large classes, six types and around 33 subtypes based on the nature of the effector complex and Cas enzymes involved (Furtado *et al.*, 2021). Here, we found that all Brazilian strains of *P. citrulli* have *cas3* and *cas10* proteins, which are included in class I. The presence of these proteins in the *P. citrulli* genomes is essential for the bacterial response. In this case, the *Crispr*-based bacterial response can be divided into three important phases: adaptation, expression and interference, therefore, the action of Cas proteins occurs in the first phase (adaptation), where the invading organism is detected and processed by a complete set of Cas proteins (Deveau *et al.*, 2008, Makarova *et al.*, 2020). (Fig. 2).

The presence of plasmids pACM6 and pAC53 was verified only in strains CCRMAc8, CCRMAc9, and IBSBF1521, which has greater similarity with group I (reference strain M6). The predicted plasmids showed GC content ranging from 60.63 (CCRMAc8) to 61.25% (IBSBF1521). Plasmids contain accessible genes in their composition with several unknown or even hypothetical functions (Smalla *et al.*, 2015). In addition, certain plasmids, such as pAMC6, may contain in their composition genes responsible for plasmid replication, maintenance and transfer, such as the genes *stbB*, *repA*, *parA* and *parB*, *traX* and *mobC* (Yang *et al.*, 2016). According to these authors, the annotation of the plasmid pAMC6 has all the genes necessary for the synthesis of a functional type IV secretion system.

The presence of proteins essential for the type III secretion system was predicted in our study. The mechanisms by which plant pathogenic bacteria regulate the type III secretion system are crucial for the infection process (Tampakaki *et al.*, 2010) and these mechanisms have been well reported in some plant bacteria. For example, *hrpG* and *hrpX* regulate the coordination system in bacteria of the genus *Xanthomonas* spp. (Xue *et al.*, 2014) and *HrpB* in *Ralstonia solanacearum* (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2019). *hrpX* and *hrpB* encode AraC-type transcriptional activators that directly intercede in the expression of several *hrp/hrc* operations, in addition to many genes of the type III transmission system. Orthologous genes of the *hrpG* and *hrpX/hrpB* groups found in the *P. citrulli* Aac5 strain belonging to group II are critical for its pathogenicity, according to Zhang *et al.* (2018). The authors also report that *HrpG* triggers the expression of *hrpX*, which consequently regulates the expression of a T3E gene belonging

to the YopJ family. Among the predicted effector proteins in our study, we found that all strains had a type IV pilin protein (Supplementary Table S1). Group IV pili are associated with the virulence of *P. citrulli* strains. These appendages are found on the external surface of several bacteria and contribute to important bacterial activities and characteristics, including adhesion to the host surface, colonization, aggregation, biofilm formation, and uptake of genetic material (Craig *et al.*, 2004; Nudleman; Kaiser., 2004). Previous studies have shown that the group I pslb65 strain completely lost its motility ability when the PilA gene was suppressed. These results may vary between different groups. Yang 2023 received that the group II strain, named Aac5, only partially lost its *twitching* motility in the pilA mutant. It is important to highlight that group I and II strains differ in their T3S effector repertoire (Eckshtain-Levi *et al.* 2014), and in this study we found that there are proteins that differ from the strains studied here. We were able to detect the effector protein XopE/AvrPphe family type III secretion system effector, in which the protein is present in all group I strains and absent in the group II strain (IBSBF1627).

Conclusion

We confirmed the predominance of two phylogenomic lineages, with predominance of *P. citrulli* group I strains in Brazil and verified that all strains had *cas* genes in their composition. The study revealed for the first time the presence of plasmids pACM6 and pAc53 in Brazilian strains of *P. citrulli*, in which they varied between 49553 bp and 48074 bp. Furthermore, through the prediction of effector proteins we can also differentiate group I and II strains of Brazilian *P. citrulli*, verifying the presence of the XopE/AvrPphe protein. The present study will contribute to the understanding of the population diversity of Brazilian strains of *P. citrulli* and will assist in the development of techniques for managing bacterial fruit blotch, mainly in melon crops in Northeastern Brazil.

Acknowledgments

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 for a scholarship to D. F. Duarte and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), with the research fellowship awarded to E. B. Souza (Proc. 311365/2020-5).

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

Author Contributions

EBS, MASG and DFD conceived and designed the study; DFD and LPL conducted the *in silico* analysis; DFD, LPL, MASG and EBS analyzed the data; DFD, MASG and EBS wrote the manuscript with contributions from LPL, AMBI, FA, VA and BB; all authors read and approved the final manuscript version.

Literature Cited

Andrews S (2010) FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.

<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Assis SMP, Mariano RLR, Silva-Hanlind DMW, Duarte V (1999) Mancha aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrullino* estado do Rio Grande do Norte. Fitopatologia Brasileira 24:191.

Assunção EF, Conceição CS, Mariano RLR, Souza EB (2019) Situação atual da mancha aquosa, importante bacteriose em meloeiro e melancia. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica 16:51-73.

Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS., Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski A Det al (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its application to single-cell sequencing. Journal of computational biology 19:455-477.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30:2114-2120.

Carvalho FC, Santos LA, Dias RC, Mariano RL, Souza EB (2013). Selection of watermelon genotypes for resistance to bacterial fruit blotch. Euphytica 190:169-180.

Du J, Liu Y, Zhu, H (2023). Genome-based analyses of the genus *Acidovorax*: proposal of the two novel genera *Paracidovorax* gen. nov., *Paenacidovorax* gen. nov. and the reclassification of *Acidovorax antarcticus* as *Comamonas antarctica* comb. nov. and emended description of the genus *Acidovorax*. Archives of Microbiology 205:42.

Eckshtain-Levi N, Munitz T, Zivanovic M, Traore SM, Sproer C, Zhao B, Welbaum G, Walcott R, Sikorski J, Burdman S (2014). Comparative Analysis of Type III Secreted Effector Genes Reflects Divergence of *Acidovorax citrulli* Strains into Three Distinct Lineages. Phytopathology 104:1152-1162.

- Eckshtain-Levi N, Shkedy D, Gershovits M, Silva GM., Tamir-Ariel D, Walcott R, Pupko T, Burdman S (2016). Insights from the genome sequence of *Acidovorax citrulli* M6, a group I strain of the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits. *Frontiers in microbiology* 7:430.
- EPPO. EPPO Global Database. Available: <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMAC>. Accessed: 21 August 2023
- Furtado LL, Rego-Machado CM, Marin-Ramirez G, Freitas NC, Molinari HBC, Santiago TR (2021). CRISPR/CAS: do sistema imune de procariotos ao controle de doenças de plantas.
- Gong B, Shin M, Sun J, Jung CH, Bolt EL, van der Oost J, Kim JS (2014). Molecular insights into DNA interference by CRISPR-associated nuclease-helicase Cas3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:16359-16364.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 57:81-91.
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 8:1072-1075.
- Hopkins DL, Thompson CM. Evaluation of *Citrus* sp. germ plasm for resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Disease*. 2002; 86:61-64.
- Hui X, Chen Z, Lin M, Zhang J, Hu Y, Zeng Y, Cheng X, Ou-Yang L, Sun MA, White AP *et al* (2020). T3SEpp: an integrated prediction pipeline for bacterial type III secreted effectors. *MSystems* 5:10.
- Huo Y, Nam KH, Ding F, Lee H, Wu L, Xiao Y, Ke A (2014). Structures of CRISPR Cas3 offer mechanistic insights into Cascade-activated DNA unwinding and degradation. *Nature structural & molecular biology* 21:771-777.
- IBGE. 2021. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. Available: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa>. Accessed 21 August 2023
- Jiménez-Guerrero I, Pérez-Montaña F, Da Silva GM, Wagner N, Shkedy D, Zhao M, Burdman S (2019). Show me your secret (ed) weapons: a multifaceted approach reveals novel type III-secreted effectors of a plant pathogenic bacterium. *bioRxiv* 679126.
- Katoh K, Standley DM (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol* 30:772-780.

- Letunic I, Bork P (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research* 49:W293–W296.
- Meier-Kolthoff JP, Carbasse JS, Peinado-Olarte RL, Göker M (2022). TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *NucleicAcids Res*50:D801-D807.
- Melo AL, Tabaldi ND, Mehta A, Marques ASA (2014). Comparing *Acidovorax citrulli* strains from melon and watermelon: Phenotypic characteristics, pathogenicity and genetic diversity. *Tropical Plant Pathology*39:154-162
- DE MELO EA, Mariano RLR, Laranjeira D, Santos LA, Gusmão LO, Souza EB (2015). Efficacy of yeast in the biocontrol of bacterial fruit blotch in melon plants. *Tropical Plant Pathology*40:56-64Oliveira A, Santos MHM, Silveira EB, Gomes AMA, Mariano RLR (2006). Biocontrole da mancha aquosa do meloeiro pelo tratamento de sementes com bactérias epifíticas e endofíticas. *Horticultura Brasileira*24:373-377.
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla Met al (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic acids research*42:D206-D214.
- Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, Fookes M, Falush D, Keane JA, Parkhill J (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*31:3691–3693.
- Pritchard L, Glover, RH, Humphris S, Elphinstone JG, Toth IK (2015). *Anal. Methods*8:12-24.
- Richter M, Rosselló-Móra R (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*106:19126-19131.
- Robertson J, Nash JHE (2018). MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *MicrobGenom*4:1-7.
- Sales Júnior R, Menezes, JB (2001). Mapeamento das doenças fúngicas, bacterianas e viróticas do cultivo do melão no Estado do RN. Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró.

- Silva GM, Souza RM, Yan L, Sales Júnior R, Medeiros FHV, Walcott RR (2016a). Strains of the group I lineage of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbitaceous crops, are predominant in Brazil. *Phytopathology* 106:1486-1494.
- Silva KMM, Xavier AS, Gama, MAS, Lima, NB, Lyra MDCCP, Mariano RLR, Souza, EB (2016b). Polyphasic analysis of *Acidovorax citrulli* strains from northeastern Brazil. *Scientia Agricola* 73:252-259.
- Sinkunas T, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2011). Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *The EMBO journal* 30:1335-1342.
- Tian Y, Zhao Y, Zhou J, Sun T, Luo X, Kurowski C, Walcott, RR (2020). Prevalence of *Acidovorax citrulli* in commercial cucurbit seedlots during 2010–2018 in China. *Plant disease* 104:255-259.
- Trifinopoulos J, Nguyen LT, Von Haeseler A, Minh, BQ (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research* 44:W232–W235.
- Walcott RR, Fessehaie A, Castro AC. Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit hosts. *Journal of Phytopathology*. 2004; 152:277-285.
- Webb RE, Goth RW (1965). A seedborne bacterium isolated from watermelon. *Plant Disease Reporter* 49:818-21.
- Wechter WP, Levi A, Ling KS, Kousik C, Block CC (2011). Identification of resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* among melon (*Cucumis* spp.) plant introductions. *HortScience* 46:207-212.
- Yan S, Yang Y, Wang T, Zhao T, Schaad NW (2013). Genetic diversity analysis of *Acidovorax citrulli* in China. *European Journal of Plant Pathology* 136:171-181.
- Yang R, Garcia DS, Montaña PF, Silva MG, Zhao M, Guerrero JI, Burdman, S (2019). Complete assembly of the genome of an *Acidovorax citrulli* strain reveals a naturally occurring plasmid in this species. *Frontiers in Microbiology* 10:1400.
- Yang Y, Fei N, Ji N, Qiao P, Yang L, Liu D, Guan W, Zhao, T (2023). pilA Gene Contributes to Virulence, Motility, Biofilm Formation, and Interspecific Competition of Bacteria in *Acidovorax citrulli*. *Microorganisms* 11:1806.

Yang Y, Qiao P, Wang T, Ji W, Fei N, Zhang L, Guan W, Zhao T (2022). Further Characterization of Host Preference of *Acidovoraxcitruilli* Based on Growth Competition between Group I and Group II Strains. Horticulturae8:1173.

Zhang X, Zhao M, Jiang J, Yang L, Yang Y, Yang S, Zhao T (2020). Identification and functional analysis of AopN, an *Acidovoraxcitruilli* effector that induces programmed cell death in plants. International Journal of Molecular Sciences21:6050.

Zhang X, Zhao M, Yan J, Yang L, Yang Y, Guan W, Zhao T (2018). Involvement of hrpX and hrpG in the virulence of *Acidovoraxcitruilli* strain Aac5, causal agent of bacterial fruit blotch in cucurbits. Frontiers in Microbiology9:507.

Zlatkovic N, Gasic K, Kuzmanovic N, Prokic A, Ivanovic M, Zovkovic S, Obradovic (2022). Polyphasic characterization of *Acidovorax citruilli* strains originating from serbia. Agronomy 2:235

Table 1. General characteristics and relevant information of sequenced strains of *Paracidovorax citrulli* from Brazil

Parameters	Strains																
	CCRMaC12	CCRMaC1.12	CCRMaC1.43	CCRMaC1.45	CCRMaC1.73	CCRMaC1.78	CCRMaC1.83	CCRMaC5.1	CCRMaC5.3	CCRMaC5.28	CCRMaC8	CCRMaC9	CCRMaCmP2	CCRMaCR2	IBSBF1214	IBSBF1521	IBSBF1627
Genomeleng th (bp)	4,769,369	4,714,945	4,786,390	4,778,659	4,798,004	4,765,464	4,796,320	4,787,299	4,844,472	4,785,933	4,817,077	4,817,808	4,816,063	4,759,031	4,786,754	4,863,575	5,134,657
GC Content (%)	69	69	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	68,9	69	69	68,9	68,9	68,9
Numberofco dingsequenc es	4532	4472	4562	4572	4596	4542	4592	4571	4635	4564	4596	4602	4602	4530	4576	4658	5022
Largestconti g N50	387,708	336,687	383,600	383,599	383,600	383,600	383,600	387,542	383,601	383,600	286,527	336,669	383,600	383,600	383,600	383,600	304,264
NumberofRN As	148,160	133,581	146,522	170,686	133,580	131,905	161,592	161,592	170,687	146,592	161,583	150,361	149,251	133,585	170,687	133,585	84,151
Numberofco ntigs	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	51	49	50	51
GenomeAcc ession*	67	67	68	79	68	71	67	72	65	69	69	70	67	67	70	73	127
	SAMN24812615	SAMN24812616	SAMN24812624	SAMN24812620	SAMN24812618	SAMN24812617	SAMN24812621	SAMN24812630	SAMN24812628	SAMN24812625	SAMN24812634	SAMN24812614	SAMN24812627	SAMN24812619	SAMN24812622	SAMN24812632	SAMN24812629

*The Bioproject PRJNA735651.

Table 2. Occurrence of plasmids in threestrains of *Paracidovorax citrulli* group I

STRAIN	PLASMID (CODE)*	PLAMISD LENGTH (bp)	CONTENT GC (%)	DESCRIPTION (NCBI)	IDENTITY PERCENTAGE (NCBI) (%)	COD. ACCESSION (NCBI)
CCRMaC8	AH419	49505	61,23	<i>Paracidovorax citrulli</i> strain M6 plasmid pAC53	99,62	CP029374.1
				<i>P. citrulli</i> strain NWB SC196 plasmid pAC53	99,32	CP042322.1
CCRMaC9	AH419	48074	60,63	<i>P. citrulli</i> strain M6 plasmid pACM6	99,79	CP029374.1
				<i>P. citrulli</i> strain NWB SC196 plasmid pAC53	99,44	CP042322.1
IBSBF1521	AH419	49553	61,25	<i>P. citrulli</i> strain M6 plasmid pACM6	99,62	CP029374.1
				<i>P. citrulli</i> strain NWB SC196 plasmid pAC53	99,32	CP042322.1

*Code generated by MOB-Recon software

Figure 1. Maximum-likelihood phylogenetic tree based on core genes of sequenced strains of *P.citrulli* (CCRM) and species of genus *Paracidovorax* (A) and strains of *P. citrulli* (B). Numbers at nodes are bootstrap values (>50%) from 1000 repetitions. Bar represents the expected number of substitutions per site. Superscripts following strain names: T = type strain of a species; R = Strains Representatives of group I and group II.

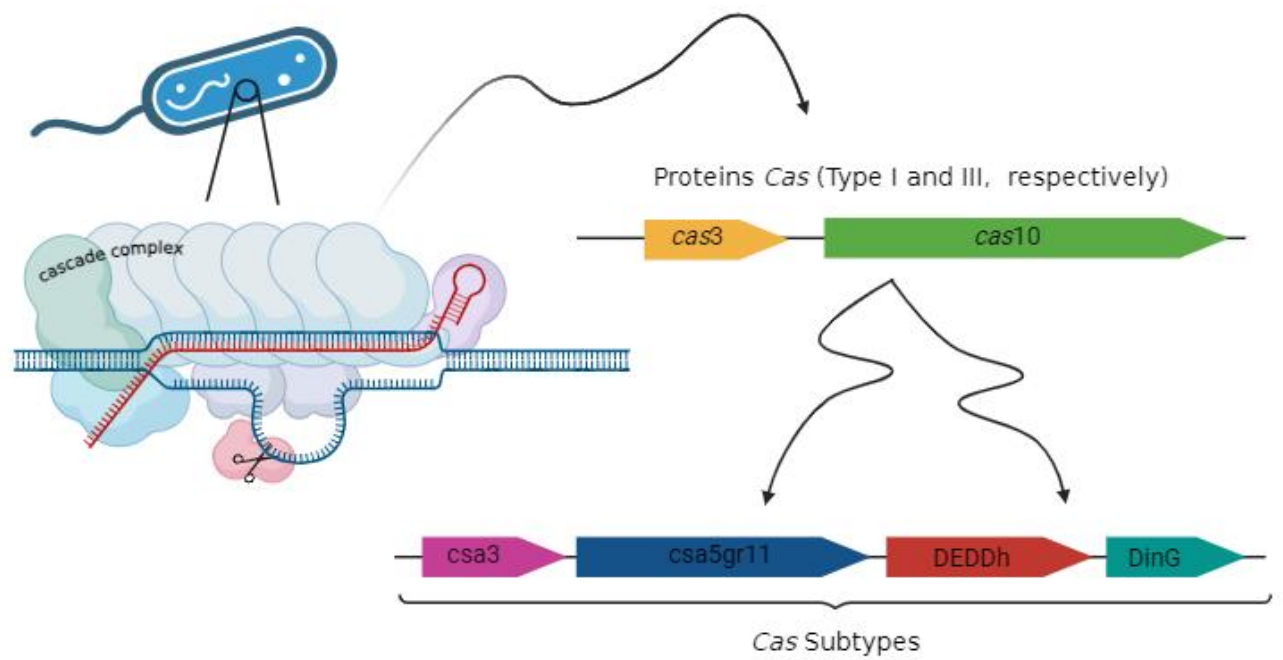


Figure 2. Representative diagram of *cas* proteins found in all Brazilian genomes of *Paracidovorax citrulli* and its subtypes. Image created by BioRender.com.

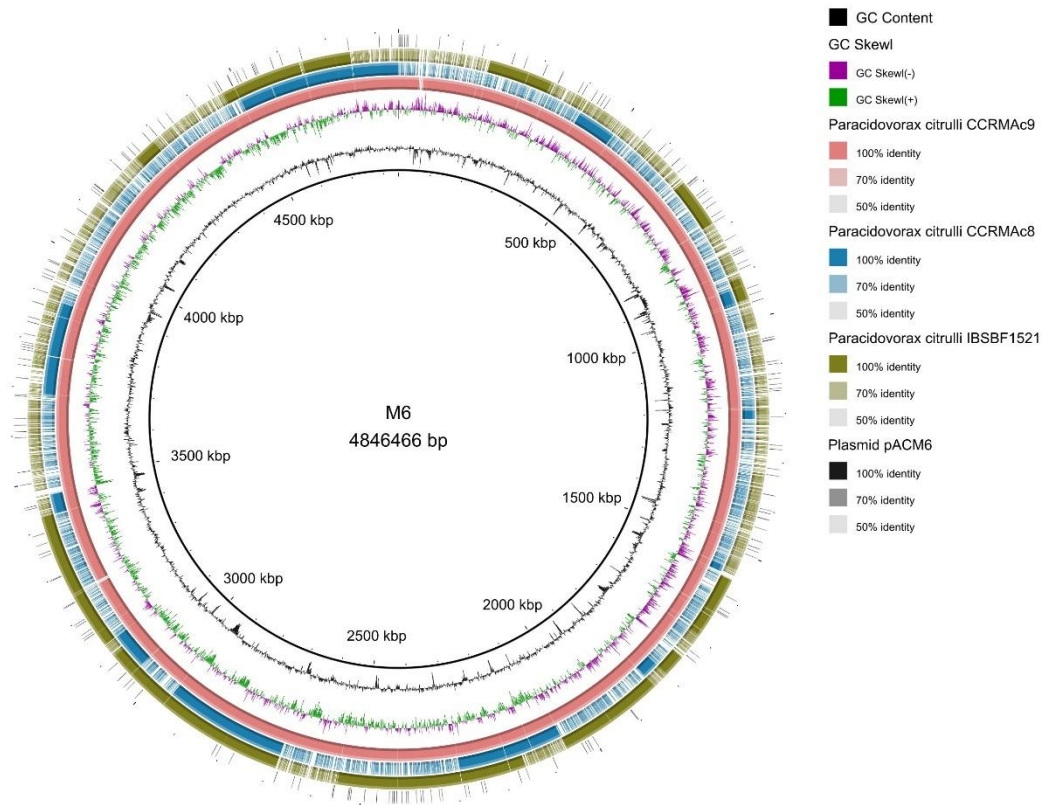


Figure 3. Circular visualization between the genomes of Brazilian strains of *Paracidovorax citrulli*. Graphs located in the inner center indicate GC content and GC asymmetry diagrams, in addition to the reference genome (M6). Colored rings indicate *P. citrulli* strains CCRMAc9, CCRMAc8 and IBSBF1521, respectively.

Supplementary Table S1: Table representing the percentage of identity (ANIm) and dDDH between genomes of *Paracidovorax citrulli* strains from Brazil (CCRM) and species of the genus *Paracidovorax*. ANIm represented at the top and dDDH represented at the bottom. Superscripts after strain names: T = type strain of a species.

Supplementary Table S2: Table representing the percentage of identity (ANIm) and dDDH between genomes of *Paracidovorax citrulli* strains from Brazil (CCRM) and *P. citrulli* strains. ANIm represented at the top and dDDH represented at the bottom. Superscripts after strain names: T = type strain of a species; R = Strains Representatives of group I and group II.

Supplementary Table S3: Predicted proteins for type III (T3S) and IV (T4S) secretion systems of Brazilian *Paracidovorax citrulli* strains

CAPÍTULO III

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR EXTRATO DE *Momordica charantia* E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA CONTRA *Paracidovorax citrulli*

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR EXTRATO DE
Momordica charantia **E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA CONTRA *Paracidovorax***
citrulli

David Ferreira Duarte¹, Bruno Leonardo Mendes², Thais Ribeiro Santiago², Marco Aurélio Siqueira da Gama¹ e Elineide Barbosa de Souza^{3*}

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.

² Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brazil.

³Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Autor correspondente: E. B. de Souza; E-mail: elineide.souza@ufrpe.br

RESUMO

A bactéria *Paracidovorax citrulli* é o agente causal da mancha aquosa, uma importante fitobacteriose que afeta a cultura do meloeiro, principalmente no Nordeste do Brasil. Apesar dos métodos de controle disponíveis, epidemias continuam ocorrendo, o que torna fundamental a busca por novas tecnologias. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo sintetizar AgNPs a partir do extrato aquoso de folhas de *Momordica charantia*, realizar a caracterização das nanopartículas sintetizadas e analisar a atividade antibacteriana *in vitro* das AgNPs contra três isolados de *P. citrulli*. As AgNPs foram sintetizadas com diferentes concentrações de folhas de *M. charantia* e, nitrato de prata (AgNO₃). As AgNPs foram confirmadas e caracterizadas por espectroscopia ultravioleta-visível, espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier, reflectância total atenuada, além de análises de espalhamento de luz dinâmica, potencial zeta, índices de polidispersividade das AgNPs, microscopia eletrônica de transmissão e determinação da estrutura cristalina das nanopartículas. O efeito das AgNPs, produzidas com 5 g folha.100 mL⁻¹, contra *P. citrulli* foi determinado por meio da inibição do crescimento bacteriano em meio líquido, motilidade do tipo *swimming* e formação de biofilme. Os resultados da caracterização das AgNPs sintetizadas com o extrato das folhas de *M. charantia* estavam dentro dos padrões estabelecidos, indicando a formação de nanopartículas estáveis. O efeito das AgNPs na inibição do desenvolvimento dos isolados de *P. citrulli* foi depende das concentrações, sendo que a concentração de 225 µmol.L⁻¹ reduziu mais de 50% do crescimento para todos os isolados. As concentrações de 225 µmol.L⁻¹ e 375 µmol.L⁻¹ reduziram

significativamente a motilidade *swimming* e a formação de biofilme nos três isolados de *P. citrulli*. Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro relato da síntese verde de AgNPs obtidas do extrato de folhas de *M. charantia* no controle de *P. citrulli*.

PALAVRAS-CHAVE: Nanotecnologia; extrato de melão-de-São-Caetano; *Cucumis melo*; mancha aquosa, controle alternativo.

ABSTRACT

The bacterium *Paracidovorax citrulli* is the causal agent of bacterial fruit blotch, an important phytobacterial disease that affects melon crops, mainly in Northeastern Brazil. Despite the available control methods, epidemics continue to occur, which makes the search for new technologies essential. Therefore, the present study aimed to synthesize AgNPs from the aqueous extract of *Momordica charantia* leaves, characterize the synthesized nanoparticles and analyze the *in vitro* antibacterial activity of AgNPs against three strains of *P. citrulli*. AgNPs were synthesized with different concentrations of *M. charantia* leaves and silver nitrate (AgNO_3). The AgNPs were confirmed and characterized by ultraviolet-visible spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, attenuated total reflectance, dynamic light scattering, zeta potential, polydispersity indices of the AgNPs, transmission electron microscopy and determination of the crystal structure of the nanoparticles. The effect of the AgNPs, produced with 5 g leaf.100 mL⁻¹, against *P. citrulli* was determined by the inhibition of bacterial growth in liquid medium, *swimming*-type motility and biofilm formation. The results of the characterization of the AgNPs synthesized with the extract of the leaves of *M. charantia* were within the established standards, indicating the formation of stable nanoparticles. The effect of the AgNPs in the inhibition of the development of the isolates of *P. citrulli* was concentration-dependent, and the concentration of 225 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ reduced more than 50% of the growth for all strains. The concentrations of 225 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ and 375 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ significantly reduced *swimming* motility and biofilm formation in the three *P. citrulli* strains. To our knowledge, this is the first report of the green synthesis of AgNPs obtained from *M. charantia* leaf extract in the control of *P. citrulli*.

KEYWORDS: Nanotechnology; melon extract; *Cucumis melo*; bacterial fruit blotch, alternative control.

INTRODUÇÃO

A bactéria *Paracidovorax citrulli* é o agente causal da mancha aquosa, importante fitobacteriose para a cultura do meloeiro no Brasil. Essa cultura é plantada principalmente na região Nordeste, responsável por mais de 90% da produção nacional, sendo o estado do Rio Grande do Norte o maior produtor [1]. A mancha aquosa é uma doença que se encontra distribuída em oito Estados brasileiros, ocasionando perdas de produtividades que podem chegar a 100% em condições favoráveis ao seu desenvolvimento [2].

A bactéria pode infectar seu hospedeiro em todos seus estágios de desenvolvimento, desde mudas até frutos. Contudo, os sintomas mais evidentes são observados nos frutos, os quais se tornam impróprios para comercialização, exibindo pequenas manchas oleosas que se expandem e se tornam marrons e necróticas com ou sem rupturas no centro [3]. Na polpa do fruto observa-se uma podridão seca devido à colonização bacteriana, ocorrendo a infecção da semente externa e internamente através do hilo, o que dificulta sua erradicação [4]. A principal forma de disseminação da doença é por sementes, portanto, a utilização de sementes livres do patógeno é a estratégia mais importante para o manejo da mancha aquosa. Também são recomendados como medidas de controle a aplicação foliar com cúpricos ou com o indutor de resistência acibenzolar-S-metil [5], rotação de culturas e erradicação de restos culturais, cucurbitáceas selvagens e plantas voluntárias [6–8]. Porém, novas epidemias da mancha aquosa ainda vêm sendo relatadas [9], sendo necessária a busca por novas alternativas de controle.

Tecnologias inovadoras, sustentáveis e de baixo impacto ao meio ambiente, têm surgido como uma ferramenta promissora na agricultura, a exemplo da nanotecnologia. O papel das nanopartículas no controle de fitobacterioses está relacionado a três diferentes métodos de atuação: 1. como transportadoras de produtos químicos antibacteriano; 2. como bioestimulantes para maximizar o mecanismo de defesa das plantas contra fitobactérias; e 3. Interagindo diretamente com as células bacterianas, levando a lise celular [10]. As nanopartículas de prata (AgNPs), em especial aquelas produzidas de forma verde a partir de extratos vegetais, surgiram como potenciais transformadores no manejo de fitobacterioses [11–13].

Um aspecto crucial na síntese de nanopartículas é a escolha do agente redutor, pois ele desempenha um papel determinante nas características físico-químicas e na eficácia antimicrobiana das AgNPs [12,13]. Os extratos vegetais fornecem diversos compostos como proteínas, aminoácidos, saponinas, flavonoides, cromona, esteroides, terpenoides e fitol, os quais possuem um valor crucial para melhoria do tamanho, taxa e estabilização da redução dos nanomateriais, como também agregação e aumento da atividade antibacteriana [14].

Diversas pesquisas têm mostrado resultados promissores quando usado AgNPs no controle de fitobacterioses. Nesse sentido, AgNPs obtidas de extrato aquoso de frutas frescas de *Phyllanthus emblica* foram eficientes no controle de *Acidovorax oryzae* (isolado RS-2) *in vitro*, reduzindo o crescimento, a formação de biofilme e a motilidade da bactéria [15]. Nanopartículas de prata sintetizadas por extrato de folha de tomate, encapsuladas com quitosana também foram eficazes no controle de *Ralstonia solanacearum*, bactéria causadora da murcha bacteriana [16]. Portanto, diante do potencial das AgNPs para o manejo de doenças de plantas, o presente estudo se propôs a sintetizar AgNPs a partir do extrato aquoso de folhas de *Momordica charantia* L. (melão-de-São-Caetano); realizar a caracterização das nanopartículas sintetizadas; e analisar a atividade antibacteriana *in vitro* das AgNPs a isolados de *P. citrulli*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e isolados de *Paracidovorax citrulli*

Folhas de *M. charantia* foram coletadas de plantas sem sintomas de doenças ou injúrias, na horta didática da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizada no município de Recife-PE, Brasil. Os isolados de *P. citrulli* CCRMAc1.43 (Aac1.43), CCRMAc1.73 (Aac1.73) e CCRMAc5.3 (Aac5.3), utilizados nos experimentos, foram obtidos da Coleção de Culturas Rosa Marino (CCRM), pertencente ao Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE. Esses isolados foram previamente caracterizados como pertencentes ao grupo I de *P. citrulli* [17]. Em todos os experimentos os isolados foram cultivados em meio NYDA (10 g de dextrose, 3 g de extrato de carne, 5 g de extrato de levedura, 3 g de peptona e 18 g de ágar/L água destilada) e mantidos em B.O.D a 28 °C por um período de 48h. As suspensões foram preparadas em água destilada esterilizada (ADE) e ajustadas em espectrofotômetro (Analyser 500 M, Brasil) a uma DO_{570} de 0,25 que corresponde a $3,4 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹.

Síntese verde das AgNPs

As folhas foram lavadas com uma solução detergente de Triton X-100, diluída 1000x, seguida de tríplice lavagem com ADE, e dispostas em bancada para secagem em temperatura ambiente. A síntese foi realizada utilizando três concentrações do extrato aquoso das folhas, a partir de 2,5; 5 e 10 g de folha, que foram maceradas e imersas em 100 mL de ADE a 90 °C por 10 min. A solução foi filtrada três vezes em papel filtro qualitativo 80 g e o volume ajustado para 100 mL. A solução final de coloração verde foi usada como solução redutora e estabilizadora na síntese das AgNPs. Posteriormente, o nitrato de prata (AgNO₃) foi usado como sal precursor, dissolvido em ADE em uma concentração final de 1 mM. Em seguida, as

diferentes concentrações do extrato aquoso da folha de *M. charantia* foram misturadas com o AgNO_3 e por fim observada a mudança da cor da solução final. A síntese ocorreu na proporção extrato aquoso-nitrato de prata de 1:1.

Caracterização das AgNPs

Para analisar a espectroscopia entre o ultravioleta-visível (UV-VIS), após a mudança de cor (do verde escuro para o marrom), com aproximadamente 24h de reação, as AgNPs sintetizadas foram analisadas no comprimento de onda na faixa de 300 a 800 nm. Para isso, 100 μL de cada amostra foram pipetados em poços de placa de Elisa e, em seguida, lidas com auxílio do Multiskan SkyHigh™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) à 30 °C. A absorbância das AgNPs foi verificada em densidade óptica de 450 nm.

A identificação de grupos funcionais presentes no extrato aquoso das folhas de *M. charantia* foi realizada empregando a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), de acordo com metodologia descrita por Pavia et al. [18]. Em resumo, 1,5 mL da suspensão de AgNPs foram centrifugados a 14000 rpm por 10 min, em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi seco em estufa a 40 °C por 24h. A análise foi realizada no modo reflectância total atenuada (RTA), na qual cerca de 5 mg do pó de AgNPs foi pulverizado na superfície do cristal e depois analisado em wavenumber entre 4000 e 400 cm^{-1} . Os dados foram analisados com o software Spectragryph v1.2.16.1.

As medições de espalhamento de luz dinâmica (ELD), potencial zeta e índices de polidispersividade das AgNPs foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano Series Nano-ZS (Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido) com um laser He-Ne operando em 633 nm e o ângulo de dispersão foi ajustado para 173° para a detecção por retrodispersão. Para cada análise, as amostras foram diluídas com água deionizada na proporção de 1:20. As amostras foram analisadas em triplicata, com o número de etapas no modo automático. Os dados foram analisados usando o software ZetaSizer (Malvern Instruments). Os processos foram repetidos três vezes para avaliar a reprodutibilidade.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi utilizada para caracterizar a forma, distribuição e tamanho das AgNPs. As imagens foram obtidas por meio de microscópio JEM 1011 (JEOL USA, Inc, Peabody, MA) operando em 100 kV.

A fim de determinar a estrutura cristalina das nanopartículas, foi realizada a Difractometria de Raios-X (DRX) usando um difratômetro Bruker D2 PHASER (Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA). Para isso, a amostra foi centrifugada a 14000 rpm por 10 min, onde o pellet formado foi seco em estufa a 40 °C por aproximadamente 24h. Cerca de 1,5

g do pó de AgNP foi analisado por meio da Lei de Bragg [19], em que o comprimento de onda do raio-x foi $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$, a uma distância interplanar do ângulo de dispersão de 2θ , em uma faixa de $5-80^\circ$, com velocidade de 40 min. Os dados foram analisados por meio do software Profex 5.1.1.

Atividade antibacteriana das AgNPs a *Paracidovorax citrulli*

Ensaio da inibição do crescimento bacteriano em meio líquido

Exploramos a inibição de três isolados de *P. citrulli* (CCRMa5.3, CCRMa1.43 e CCRMa1.73) por AgNPs. Em resumo, 100 μL de diferentes concentrações de AgNPs (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 175 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 225 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 275 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 325 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 375 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), 100 μL de meio líquido NYD e 10 μL da suspensão bacteriana, foram misturados em uma placa de microtitulação de 96 poços. Posteriormente, a placa foi incubada sem agitação a 28°C por 24h. Além das concentrações, o experimento foi composto pelo controle positivo (meio de cultura + *P. citrulli*) e negativo (meio de cultura). Após 24h de incubação, foi medida a densidade óptica (DO_{600}) com auxílio do Multiskan SkyHigh™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e determinadas as concentrações que inibiram 50% e 100% do crescimento bacteriano. O experimento foi composto por 6 tratamentos e 16 repetições, representadas por um poço da placa de Elisa.

Para determinar se o efeito das AgNPs foi bactericida ou bacteriostático, 100 μL do conteúdo de dois poços escolhidos de forma aleatória em cada tratamento foram plaqueados em meio NYDA e avaliados após 24h e 48h quanto a presença ou ausência de crescimento bacteriano.

Ensaio da inibição da motilidade tipo *swimming*

Para avaliar o efeito inibitório de AgNPs na motilidade dos isolados de *P. citrulli*, foram adicionados 10 μL da suspensão de cada isolado no centro da placa de Petri contendo o meio de cultura semissólido adicionado das AgNPs nas concentrações 75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 225 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 375 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e incubadas em BOD a 28°C . Após o período de 48h foi mensurado o diâmetro da colônia bacteriana com o auxílio de um paquímetro. O experimento foi composto por 4 tratamentos e 12 repetições, representadas por uma placa de Petri.

Ensaio da inibição da formação de biofilme

Placas de microtitulação de poliestireno, de fundo plano, com 96 poços (Costar 3599 Corning Inc.) foram usadas para avaliar a formação de biofilme de acordo com o método de

quantificação colorimétrica com cristal violeta adaptado de Trentin et al. [20]. Em resumo, cada poço da placa foi preenchido com 100 μL do meio de cultura (NYD), 100 μL das respectivas concentrações de AgNPs ($75 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $225 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $375 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e 10 μL da suspensão dos isolados de *P. citrulli* (CCRMa5.3, CCRMa1.43 e CCRMa1.73). Após 36h de incubação (28°C) o conteúdo das placas foi removido e realizada triplice lavagem dos poços com solução salina esterilizada (0,9%) para retirada de células planctônicas. Posteriormente, as células bacterianas remanescentes foram fixadas pelo calor em estufa de secagem por 1h a 60°C . Logo em seguida, a camada de biofilme formada foi corada adicionando 210 μL de cristal violeta (0,5%) a cada poço durante 15 min em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas em água corrente e o corante aderido à camada de biofilme foi solubilizado em 210 μL de etanol (99,5%). A densidade óptica foi analisada com auxílio do equipamento Multiskan SkyHigh™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), em comprimento de onda de 570 nm (DO_{570}). O experimento foi composto por 4 tratamentos e 14 repetições, representadas por um poço da placa de Elisa.

Análise Estatística

Os experimentos foram repetidos duas vezes e cada isolado de *P. citrulli* foi analisado de maneira independente, sendo os dados analisados como repetição no tempo. As análises estatísticas foram realizadas pelo software Statistix version 9. Os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($P = 0,05$).

RESULTADOS

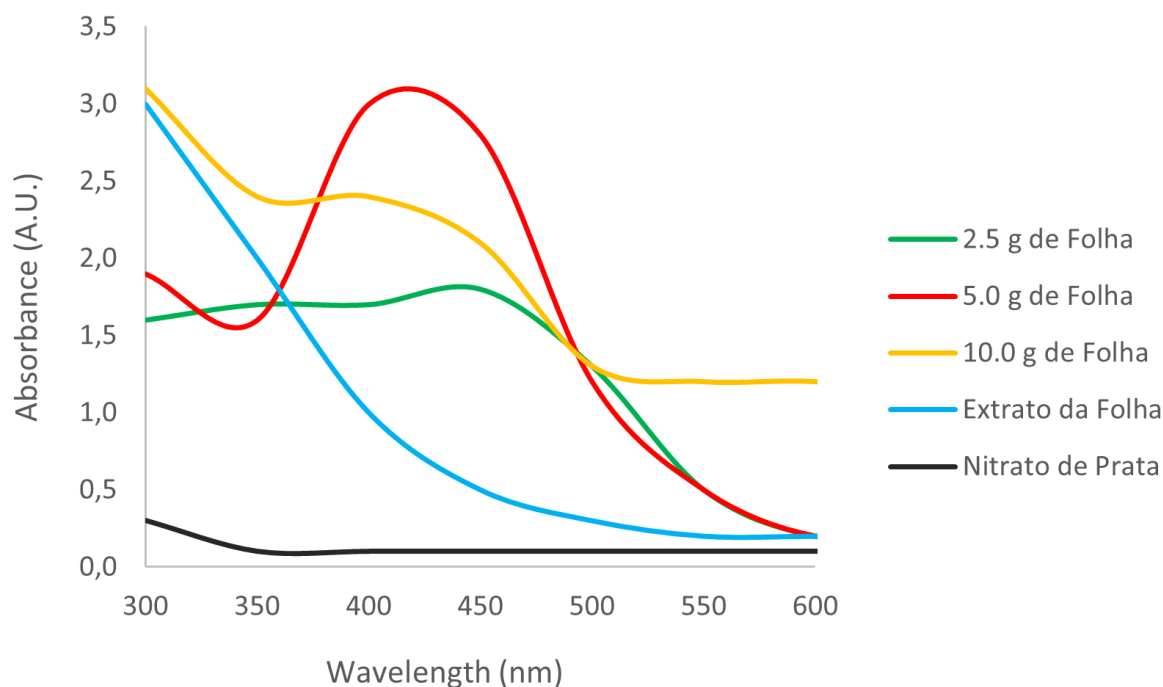
Síntese verde e caracterização das AgNPs

A redução de íons em nanopartículas de prata durante a exposição a diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas de *M. charantia* foi observada após 12h, por meio da mudança de cor da solução. Na concentração de $2,5 \text{ g folha.100mL}^{-1}$, o extrato aquoso de coloração verde escura mudou para coloração amarelo mostarda após contato com a solução de nitrato de prata, indicando fraca formação de AgNPs. Na concentração de 5 g.100 mL^{-1} , houve a mudança de cor para marrom, indicando sucesso na formação de AgNPs. Já na concentração de $10 \text{ folha.100mL}^{-1}$ ocorreu a rápida mudança na coloração, seguida de precipitação de compostos no fundo do Erlenmeyer, indicando alta instabilidade e falta de sucesso no processo da síntese e formação de AgNPs.

Por meio da análise de UV-VIS, foi verificado que as AgNPs biossintetizadas apresentaram pico de absorção entre 400 e 450 nm no espectro UV-VIS (Figura 1). Onde a

concentração 5 g folha.100 mL apresentou o melhor pico de absorção, sendo essa concentração escolhida para seguir com os experimentos contra *P. citrulli*.

Figura 1. Absorbância no ultravioleta-visível (UV-VIS) de AgNPs obtidas por síntese verde do extrato aquoso de folhas de *Momordica charantia*, após 12h.

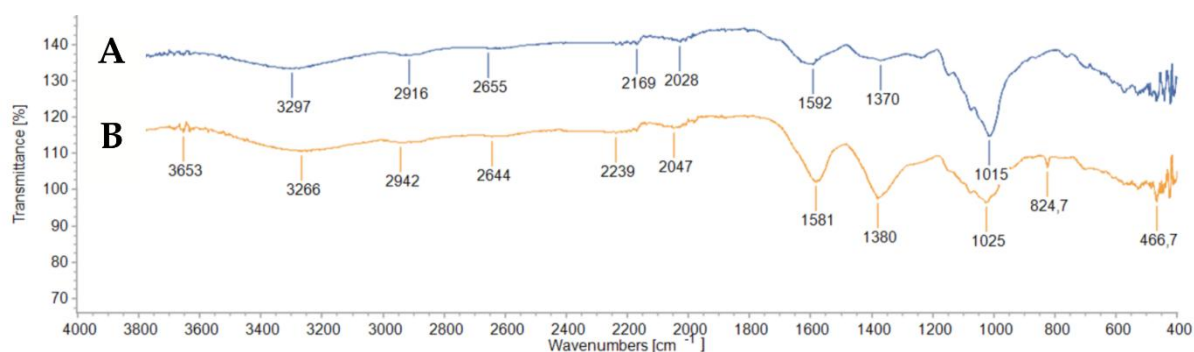


A análise de FTIR foi realizada para identificar os possíveis grupos funcionais presentes em biomoléculas do extrato de folhas de *M. charantia* e seu papel na síntese de AgNPs. A Figura 2-A mostra os principais picos de absorção que correspondem às vibrações moleculares identificadas no extrato aquoso das folhas na concentração 5 g folha.100 mL, sendo eles: 3297, 2916, 2655, 2169, 2028, 1592, 1370 e 1015 cm^{-1} .

O pico em 3297 cm^{-1} está associado à vibração de estiramento O-H, indicando a presença de grupos hidroxila (-OH) de álcoois ou ácidos carboxílicos. Pode também estar relacionado à presença de água adsorvida na superfície das nanopartículas. O pico de 2916 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento C-H, que indica a presença de cadeias alifáticas (grupos metila ou metileno, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$) provenientes de compostos orgânicos. O pico de 2655 cm^{-1} pode estar relacionado a vibrações de estiramento de ligações C-H, especialmente em ácidos carboxílicos, ou a grupos aldeídos ($-\text{CHO}$). O pico em 2169 cm^{-1} é associado à vibração de estiramento de ligações tripla $\text{C}\equiv\text{C}$ (alcinos) ou $\text{C}\equiv\text{N}$ (nitrilas), indicando a presença de grupos alquinos ou nitrilas, assim como o pico de 2028 cm^{-1} . O pico de 1592 cm^{-1} é atribuído à vibração de estiramento $\text{C}=\text{C}$ de duplas ligações em compostos aromáticos ou à vibração assimétrica do grupo carboxilato ($-\text{COO}^-$). O pico de 1370 cm^{-1} é associado à vibração de deformação C-H de

grupos metila ($-\text{CH}_3$) ou à vibração de deformação simétrica de grupos nitro ($-\text{NO}_2$). Por fim, o pico em 1015 cm^{-1} , normalmente é associado à vibração de estiramento C-O de álcoois, éteres ou ácidos carboxílicos, ou ainda a estiramentos de grupos fosfato (P-O).

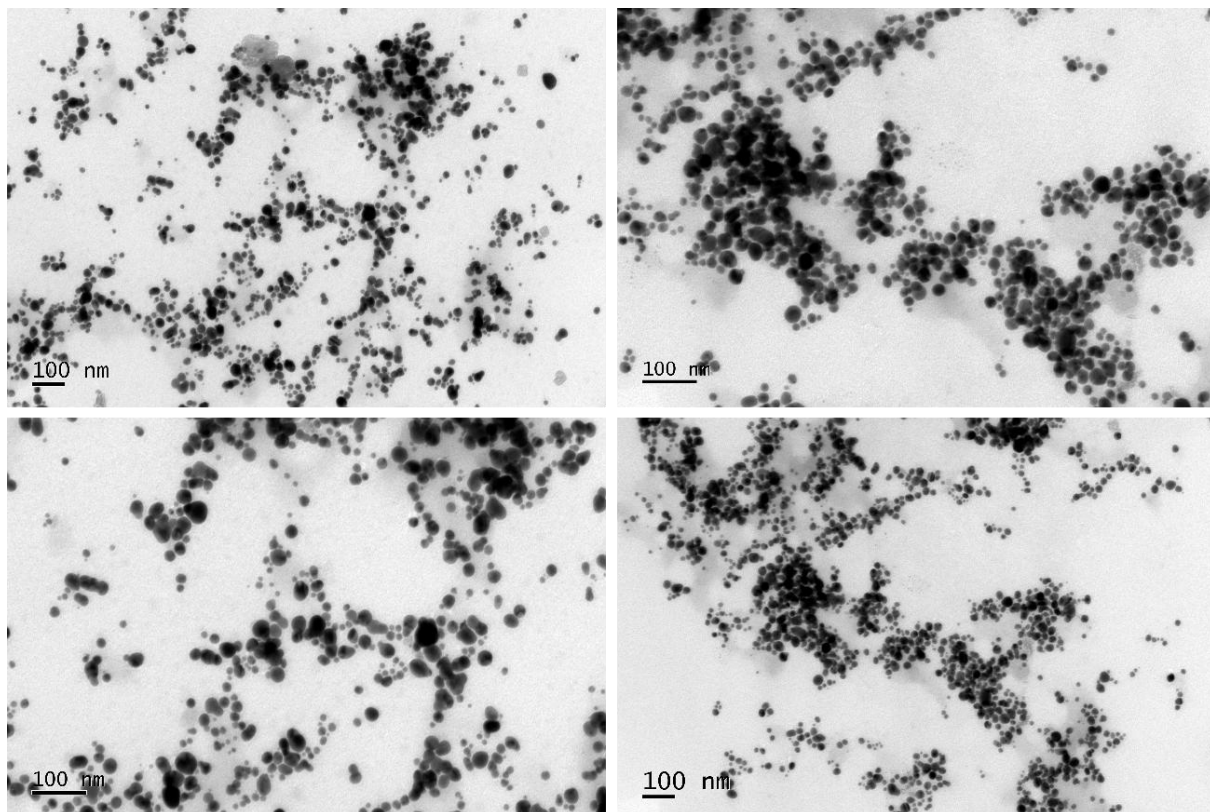
Figura 2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do extrato aquoso de *Momordica charantia* (linha azul) e AgNPs sintetizadas (linha amarela), usando a concentração 5 g folha.100 mL



Os picos também foram identificados nas AgNP sintetizadas (Figura 2-B), sendo eles 3653 cm^{-1} , que indica vibrações de estiramento O-H livre, comum em grupos hidroxila ($-\text{OH}$), principalmente de álcoois ou ácidos carboxílicos, mas sem ligações de hidrogênio significativas, com presença de grupos hidroxila "isolados" ou expostos na superfície; 824 cm^{-1} , indica vibrações de deformação fora do plano C-H em anéis aromáticos ou a vibrações de grupos funcionais como C-H em alkenos; e o pico de 466 cm^{-1} , que indica estiramento M-O (metal-oxigênio), comum em nanopartículas metálicas, indicando a interação entre o metal (neste caso, a prata) e os oxigênios presentes nos grupos funcionais ligados à superfície.

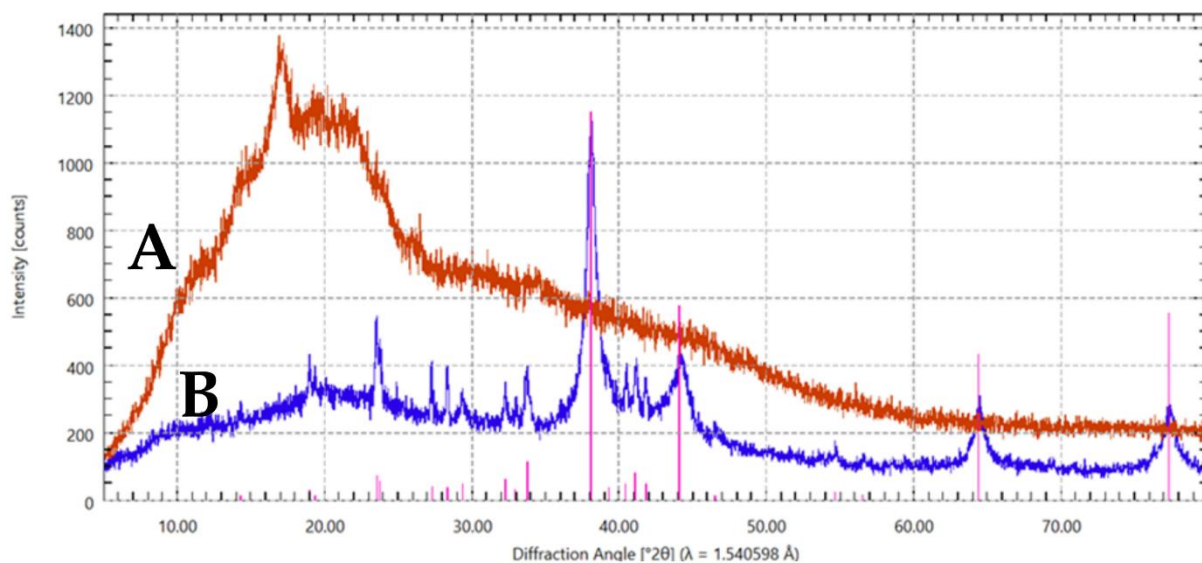
O extrato aquoso de folhas de *M. charantia*, na concentração de 5 g folha.100mL⁻¹ foi capaz de reduzir íons de prata a níveis nanométricos ($< 100\text{ nm}$), estáveis e dispersas homogeneamente, como indicado pelo tamanho hidrodinâmico (Z-average) de aproximadamente 53,05 nm, índice de polidispersividade de 0,490 e potencial zeta de -24,5 mV. A Figura 3 mostra o MET das AgNPs, confirmando o tamanho nanométrico, a forma e a polidispersividade das nanopartículas.

Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs sintetizadas por extrato aquoso de folhas de *Momordica charantia* na concentração de 5 g folha.100mL⁻¹.



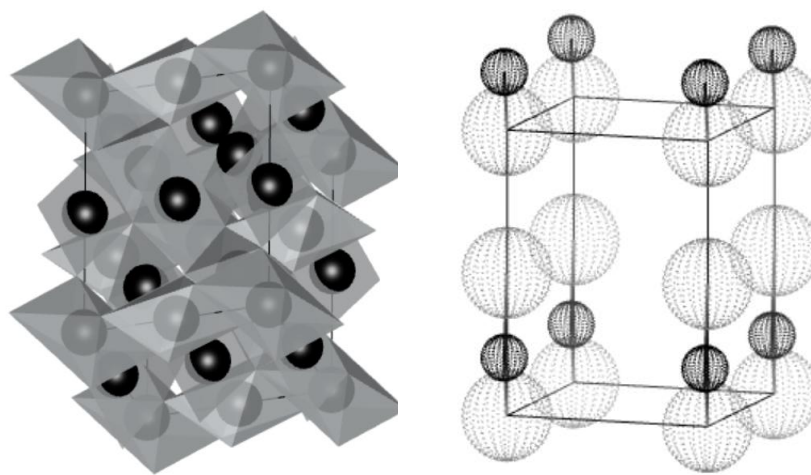
Na análise DRX foram observadas várias reflexões Bragg com valores 2θ de $38,05^\circ$; $43,95^\circ$; $64,26^\circ$; $77,27^\circ$, os quais em conjunto podem ser indexadas para as facetas 111, 200, 220 e 311 dos índices de Miller, que correspondem inteiramente com o metal prata, respectivamente (Fig. 4-B). O padrão DRX da amostra do extrato da folha não indicou contaminação por metais ou outros materiais (Fig. 4-A).

Figura 4. Difratometria de raios-x do extrato aquoso de folhas de *Momordica charantia* (linha vermelha) e das AgNPs sintetizadas (linha azul), usando concentração de 5 g folha.100 mL⁻¹.



O padrão DRX mostrou fortemente que as nanopartículas de prata sintetizadas por extrato aquoso de folhas de *M. charantia* foram de natureza cristalina atômica de face retangular e moderado nível de pureza (Figura 5), de agrupamento atômico resultando em partículas com formato esférico e tamanho aproximado de $56 \text{ nm} \pm 17 \text{ nm}$.

Figura 5. Estrutura atômica retangular, de face centrada, com presença de óxido de prata (Ag_2O). Círculos pretos indicam o elemento oxigênio (O) e a estrutura cinza indica o elemento prata (Ag).



A partir dos Índices de Miller foi possível determinar a estrutura atômica das nanopartículas. A Figura 5 mostra a estrutura atômica retangular, de face centrada, com presença de óxido de prata (Ag_2O) onde os círculos pretos indicam o elemento oxigênio (O) e a estrutura cinza indica o elemento prata (Ag).

Atividade antibacteriana das AgNPs a *Paracidovorax citrulli*

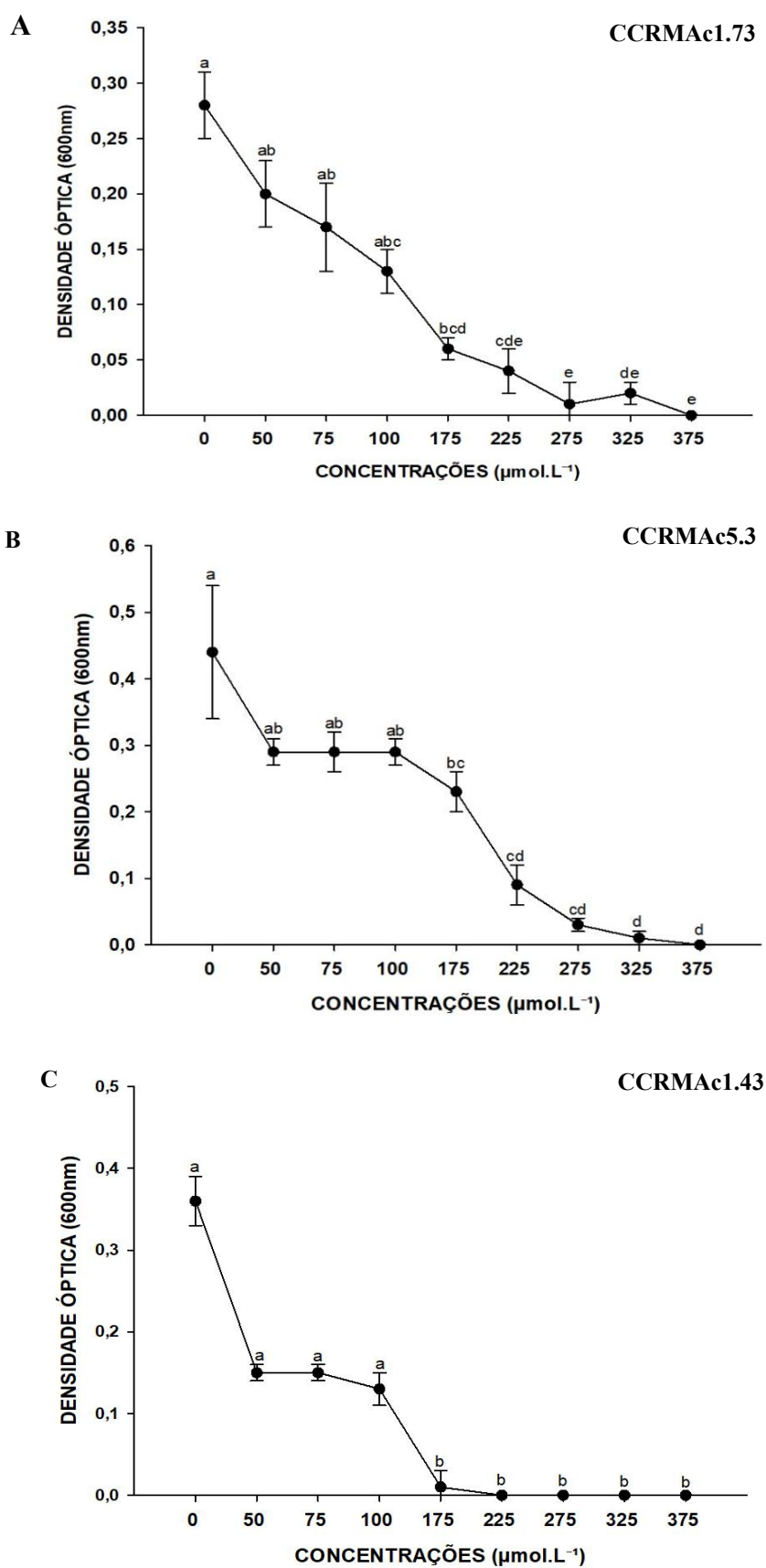
Ensaio da inibição do crescimento bacteriano em meio líquido

As AgNPs sintetizadas a partir do extrato aquoso de *M. charantia*, na concentração de $5 \text{ g folha.100mL}^{-1}$, foram escolhidas devido às suas características ideais descritas anteriormente. Para o isolado CCRMAc1.73, o crescimento bacteriano diminuiu conforme o aumento das concentrações (Figura 6-A). Os resultados indicaram que a partir da concentração de $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ cerca de 50% do crescimento bacteriano foi reduzido, embora diferença significativa do tratamento controle só foi observada a partir de $175 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AgNPs, atingindo 100% de controle na maior concentração ($375 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$). O efeito das AgNPs contra esse isolado foi bacteriostático, visto que após 24h algumas placas contendo meio de cultura já apresentavam crescimento bacteriano, e, em 48h, *P. citrulli* havia crescido em todas as placas.

O isolado CCRMAc5.3 apresentou o mesmo comportamento do isolado CCRMAc1.73. Contudo, para este isolado, foi necessária uma concentração mais elevada ($225 \mu\text{mol.L}^{-1}$) para atingir mais de 50% de redução do crescimento bacteriano (Figura 6-B), a qual diferiu significativamente do tratamento controle. A concentração de $375 \mu\text{mol.L}^{-1}$ também inibiu 100% do crescimento bacteriano desse isolado. Com relação ao efeito das AgNPs contra o isolado CCRMAc5.3, verificou-se após 24h de incubação havia crescimento bacteriano nas concentrações de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $175 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $225 \mu\text{mol.L}^{-1}$, enquanto nas concentrações de $275 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $325 \mu\text{mol.L}^{-1}$ crescimento foi observado apenas com 48 h. Contudo, na concentração de $375 \mu\text{mol.L}^{-1}$ não apresentou nenhum crescimento bacteriano. Dessa forma, comprovou-se que as concentrações $275 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $325 \mu\text{mol.L}^{-1}$ apresentaram um efeito bacteriostático, enquanto a de $375 \mu\text{mol.L}^{-1}$ se comportou como bactericida.

Para o isolado CCRMAc 1.43, verificou-se que a redução da absorbância ocorreu de forma dependente do aumento das respectivas concentrações (Figura 6-C). Diferentemente dos outros dois isolado, mais de 50% de controle foi observado a partir da concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. No entanto, diferenças significativas em relação ao tratamento controle foram observadas apenas nas concentrações acima de $175 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Considerando os resultados obtidos, as porcentagens de controle de 100% foram encontradas nas concentrações a partir de $225 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Conforme descrito anteriormente, foi repetido o mesmo procedimento para verificar o efeito bactericida ou bacteriostático das AgNPs. Observou-se que 24h após a incubação apenas as concentrações de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $175 \mu\text{mol.L}^{-1}$ apresentaram crescimento bacteriano. Após 48 h de incubação, o resultado se manteve. Dessa forma, constatou-se que as concentrações de $225 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $275 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $325 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $375 \mu\text{mol.L}^{-1}$ tiveram um efeito bactericida contra o isolado CCCRMAc1.43. Diante dos resultados obtidos para os três isolados, as concentrações $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $225 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $375 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foram selecionadas para os demais experimentos.

Figura 6. Efeito de diferentes concentrações de AgNPs no crescimento dos isolados de *Paracidovorax citrulli*.

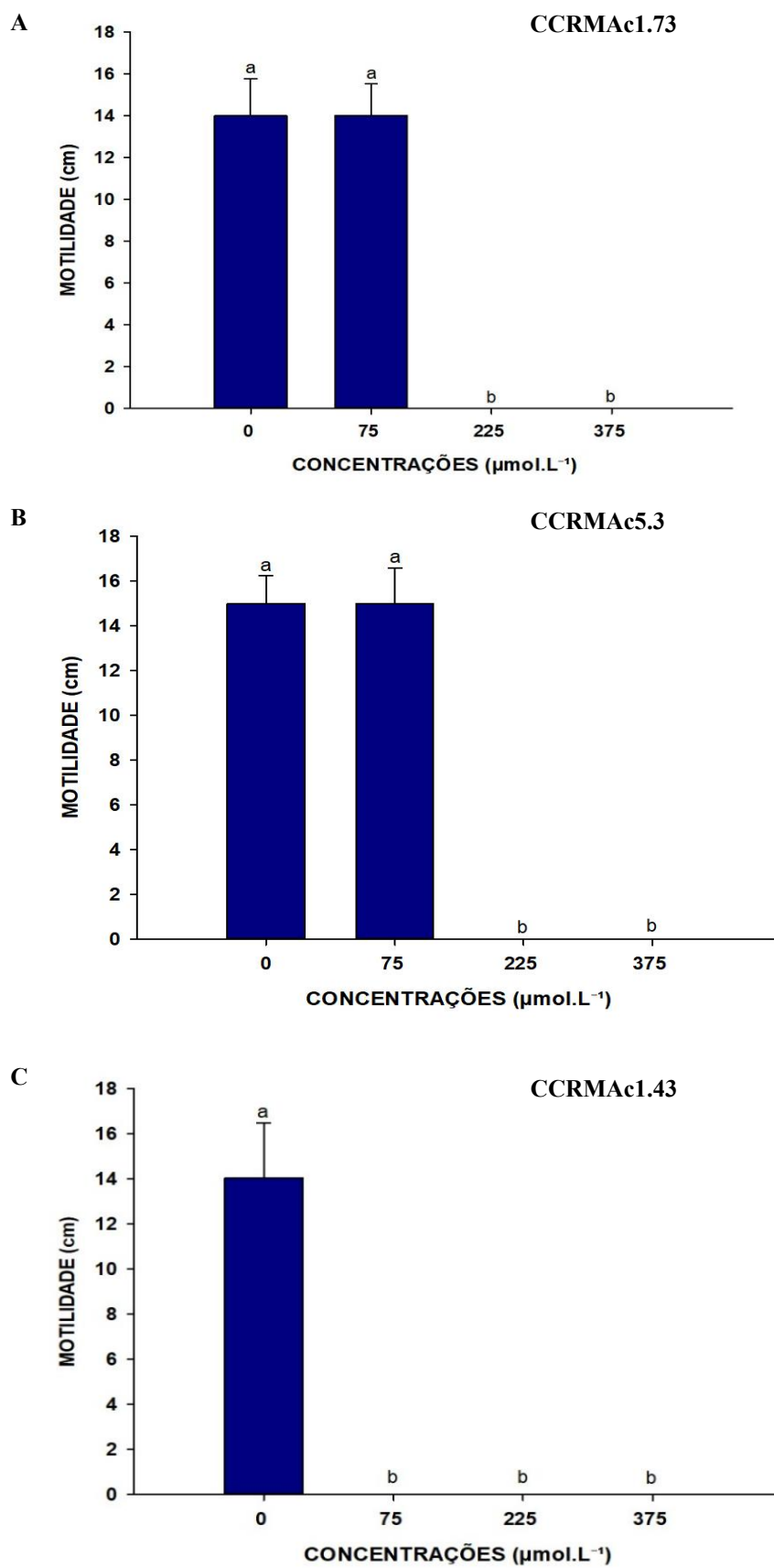


*Valores seguidos por letras iguais não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Ensaio da inibição da motilidade tipo *swimming*

Os resultados deste estudo demonstram que as AgNPs sintetizadas com folhas de *M.charantia* afetaram significativamente a motilidade *swimming* dos três isolados avaliados (Figura 9-A, B e C). As concentrações de 225 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 375 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ inibiram completamente a motilidade dos três isolados, apresentando diferença significativa em relação ao tratamento controle. Por outro lado, a concentração de 75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ não afetou a motilidade dos isolados CCRMAc1.73 (Figura 9-A) e CCRMAc5.3 (Figura 9-B), sendo eficiente apenas em relação ao isolado CCRMAc1.43 (Figura 9-C).

Figura 9. Efeito de diferentes concentrações de AgNPs na motilidade *swimming* dos isolados de *Paracidovorax citrulli*.

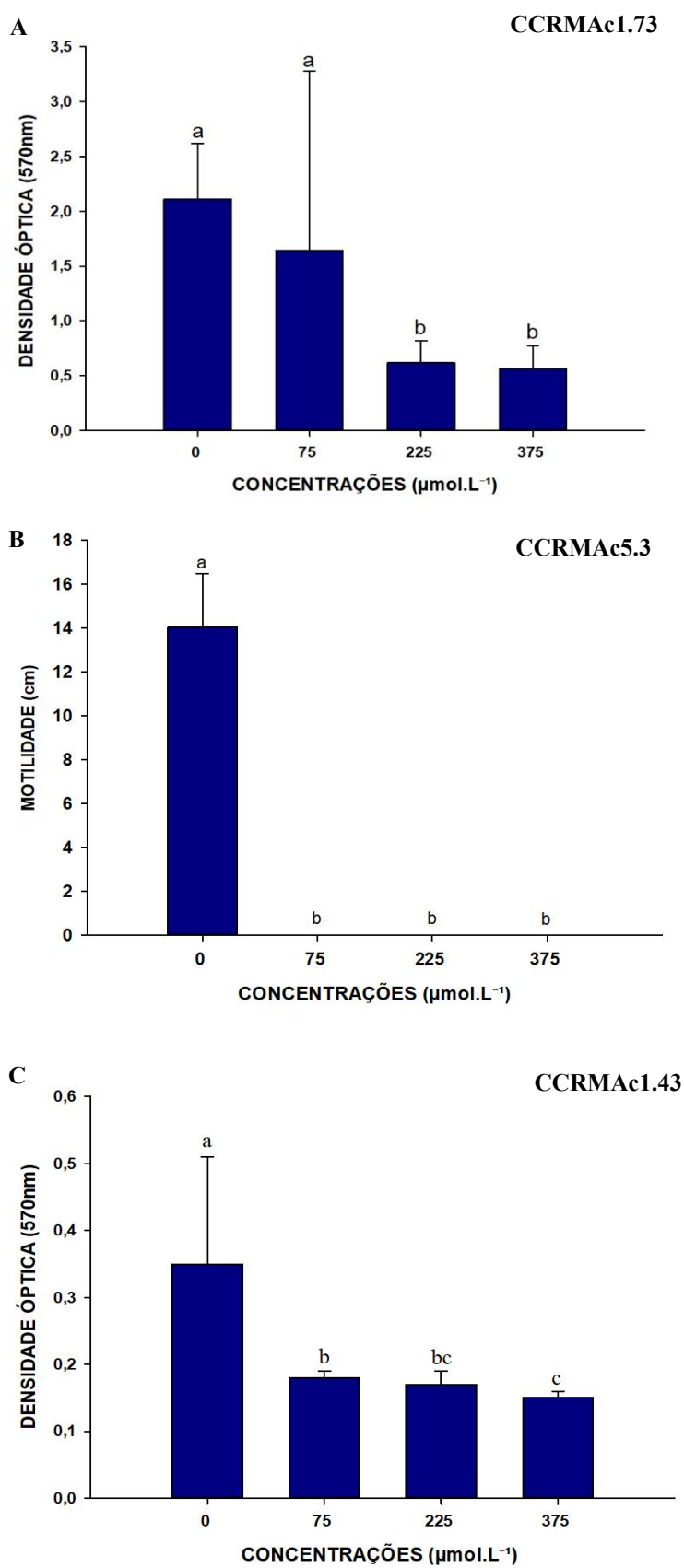


*Valores seguidos por letras iguais não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Ensaio da inibição da formação de biofilme

As três concentrações de AgNPs indicaram uma redução na formação de biofilme para o isolado CCRMAc1.73 (Figura 12-A). No entanto, reduções significativas foram observadas nas concentrações de 225 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 375 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, atenuando a formação de biofilme em 70,61% e 72,98%, respectivamente. Para o isolado CCRMAc5.3, as três concentrações de AgNPs inibiram a formação de biofilme (Figura 12-B), mas reduções de 50% foram observadas apenas nas concentrações de 225 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 375 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. O efeito das AgNPs na formação de biofilme do isolado CCRMAc1.43 foi significativo para as três concentrações, apresentando diferença estatística quando comparado com o tratamento controle. Todavia, apenas as concentrações 225 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 375 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foram eficientes em reduzir 50% da formação de biofilme (Figura 12-C).

Figura 12. Efeito de diferentes concentrações de AgNPs na formação de biofilme dos isolados de *Paracidovorax citrulli*.



*Valores seguidos por letras iguais não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

DISCUSSÃO

No presente estudo, extrato de folhas de *M. charantia*, na concentração de 5 g folha.100 mL⁻¹ foi um excelente produtor de AgNPs. O mecanismo de síntese de AgNPs pode ser explicado pelo elevado teor de ácidos carboxílicos no extrato das folhas dessa planta. Esses compostos atuam como potentes antioxidantes com alta capacidade redutora e estabilizadora de sais metálicos [21]. O conteúdo bioquímico no extrato de folhas de *M. charantia* facilita a redução dos íons de prata para partículas de prata em escala nanométrica, devido à capacidade de doação de elétrons desses compostos, como o ácido gálico [22]. A análise de FTIR identificou picos de absorção que sugerem a presença desses grupos funcionais, indicando interações entre biomoléculas do extrato e a superfície das nanopartículas, além de grupos típicos de compostos orgânicos provenientes do extrato da planta, como ácidos carboxílicos.

A síntese das nanopartículas foi observada pela mudança de coloração do extrato da folha de verde para marrom. Essa mudança ocorre devido ao fenômeno de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR). As nanopartículas metálicas possuem elétrons livres, que geram a banda de absorção SPR, resultante da vibração combinada desses elétrons em ressonância com a onda de luz. As AgNPs apresentaram uma absorção acentuada com o pico próximo de 430 nm (UV-VIS), que diminuiu progressivamente à medida que o comprimento de onda aumentava, comportamento comumente observado em sínteses de AgNPs [23,24]. Quando o tamanho das partículas de prata é na escala de nanômetros, o comprimento de onda de SPR tende a ficar na região de aproximadamente 450 nm [25–27].

O extrato de folhas de *M. charantia* na concentração de 5 g folha.100 mL⁻¹, sintetizou AgNPs estáveis. Geralmente, uma suspensão que apresenta um Potencial Zeta inferior a ± 20 mV é considerada instável e resulta na sedimentação das partículas fora da solução na ausência de outros fatores [28]. Nesse trabalho o Potencial Zeta de -24,5 mV, indicou forte estabilidade coloidal, com muitas cargas negativas em sua superfície, o que pode ajudar na estabilidade da suspensão coloidal devido à repulsão eletrostática entre as partículas. O índice de polidispersividade foi moderado, sugerindo que as AgNPs não são completamente uniformes em tamanho, mas não são extremamente variadas. O tamanho uniforme das nanopartículas é essencial para garantir um desempenho consistente e controlado dos materiais em suas diferentes aplicações [29].

Os índices de Miller são números inteiros que descrevem os planos cristalinos em um cristal e são usados para identificar e caracterizar os planos de difração observados em um padrão de DRX de uma partícula [30]. O tamanho médio cristalino das AgNPs foi encontrado

como sendo de 56 nm, confirmado pela análise de MET. Essas características são bem comuns em nanopartículas de prata sintetizadas por extratos vegetais [31,32].

A síntese de AgNPs usando plantas é considerada uma abordagem bem consolidada para o desenvolvimento de estratégias de controle segura e competente contra diversas bactérias [33–38]. Os resultados *in vitro* demonstraram que AgNPs sintetizada a partir de folhas de *M. charantia*, tiveram atividade antibacteriana contra os três isolados de *P. citrulli* aqui avaliados, tornando-se evidente que o crescimento dos isolados foram dependentes das concentrações de nanopartículas. Constatamos um controle acima de 50% para os três isolados a partir da concentração 225 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e com controle total com 325 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AgNPs. Além disso, esses resultados podem ter relação direta com o tamanho das AgNPs (56 nm), uma vez que AgNPs com tamanho de aproximadamente 39 nm demonstram um forte efeito inibitório contra uma ampla gama de bactérias Gram-negativas [39,40]. Não existem pesquisas com AgNPs visando o controle de *P. citrulli*, mas Masum [15] verificaram que a sobrevivência de *Paracidovorax oryzae* foi afetada pelo tempo de incubação, e que após 6h de exposição a concentração de AgNPs de 20 $\mu\text{g/mL}$ teve uma redução de aproximadamente 4 log na população viável do isolado Ao RS-2 quando comparado com o controle.

Os resultados do presente estudo demonstram que concentrações de AgNPs de 225 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 375 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ afetaram diretamente a motilidade *swimming* bacteriana e foram eficazes na redução da formação de biofilmes. Diferentes tipos de sistemas de secreção exercem um papel importante na patogenicidade de *P. citrulli* em cucurbitáceas [41]. Dentre eles, o pili Tipo IV está envolvido na motilidade bacteriana e na formação de biofilme, admitindo que ele se fixe ou se dissemine no interior do hospedeiro. Pesquisas relatam que um mutante *pilM* de *P. citrulli*, que sintetiza uma proteína fundamental para montagem do pili tipo IV, mostrou redução na formação de biofilme e severidade quando comparado com o isolado selvagem [42,43]. Um mutante no gene *pilT* no isolado M6 de *P. citrulli*, apresentou redução na formação de biofilme, motilidade e severidade. Esses resultados sugerem que a formação de biofilme e motilidade *swimming* contribuem significativamente na interação de *P. citrulli*-hospedeiros. Pesquisas anteriores indicam que AgNPs sintetizadas de forma verde interagem com células bacterianas, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS), o que resulta na desnaturação de proteínas e danos a outras macromoléculas. Esses danos levam à expressão inadequada de fatores de virulência bacteriana, como a inibição da formação de biofilmes [44]. O desenvolvimento de biofilmes é um mecanismo importante para as bactérias, pois contribui para a proteção contra as respostas de defesa do hospedeiro e aumenta a sobrevivência bacteriana durante a infecção [45]. Dessa forma, a capacidade reduzida das bactérias em formar

biofilmes pode implicar na diminuição da virulência, dificultando a penetração e colonização dos tecidos do hospedeiro [46]. A motilidade bacteriana também desempenha um papel crucial no processo de colonização do hospedeiro, facilitando a infecção por meio da fixação e quimiotaxia mediada pelos pili tipo IV [47]. Em um estudo recente, Abdallah et al. [48] observaram que as AgNPs *eco-friendly*, reduziram significativamente a motilidade de *Pectobacterium carotovorum*.

Momordica charantia é uma planta eficaz na síntese de nanopartículas com características favoráveis. A partir desse estudo, ficou evidente a eficiência das AgNPs nas concentrações a partir de 225 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em reduzir o crescimento bacteriano, a motilidade *swimming* e a formação de biofilme de *P. citrulli*. Esses resultados destacam o potencial dos extratos vegetais como agentes redutores de nanopartículas em uma abordagem ecológica, oferecendo perspectivas promissoras para o desenvolvimento de métodos de síntese sustentáveis. Isso pode ampliar o uso da nanotecnologia em várias áreas, incluindo a agricultura, como o uso de nanopartículas biossintetizadas no controle de fitopatógenos, como a bactéria *P. citrulli*, que é importante para a agricultura brasileira.

Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – FinanceCode 001 pela bolsa de estudos concedida a D. F. Duarte e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), com bolsa de pesquisa concedida a E. B. Souza (Proc. 311365/2020-5).

Referências

1. FAOSTAT Statistical Database - Food and Agriculture Organization, Rome, Italy - <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> 2024.
2. European and Mediterranean Plant Protection Organization. EPPO Global Database Available online: <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMAC> (accessed on 1 August 2024).
3. De Melo, E.A.; De Lima R. Mariano, R.; Laranjeira, D.; Dos Santos, L.A.; De Omena Gusmão, L.; Barbosa De Souza, E. Efficacy of Yeast in the Biocontrol of Bacterial Fruit Blotch in Melon Plants. *Trop. plant pathol.* **2015**, *40*, 56–64, doi:10.1007/s40858-015-0008-x.
4. Isakeit, T.; Black, M.C.; Barnes, L.W.; Jones, J.B. First Report of Infection of Honeydew with *Acidovorax Avenae* Subsp. *Citrulli*. *Plant Disease* **1997**, *81*, 694–694, doi:10.1094/PDIS.1997.81.6.694C.
5. Sales, R.; Filho, F.S.T.P.; Nunes, G.H. de S.; Torres, G.R. de C. Eficiência de Acibenzolar-S-Methyl e Oxiclóreto de Cobre no Controle de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, Agente Causal da “Mancha-Aquosa” no Meloeiro. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* **2007**, *7*, 66–70.
6. *Handbook of Cucurbits: Growth, Cultural Practices, and Physiology*; Pessarakli, M., Ed.; 0 ed.; CRC Press, 2016; ISBN 978-0-429-17068-3.
7. Tuttle McGrath, M. Diseases of Cucurbits and Their Management. In *Diseases of Fruits and Vegetables Volume I: Diagnosis and Management*; Naqvi, S.A.M.H., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2004; pp. 455–510 ISBN 978-1-4020-2606-5.
8. Walcott, R.R. Integrated Pest Management Of Bacterial Fruit Blotch Of Cucurbits. In *Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria*; Ciancio, A., Mukerji, K.G., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2008; pp. 191–209 ISBN 978-1-4020-8571-0.
9. Silme, R.; Zerbo, M.; Mercati, F.; Karataş, A.; Baştaş, K.; Carimi, F.; Baysal, Ö. Molecular Tracking of *Acidovorax Citrulli*: Unveiling Pathogen Dynamics and Blotch Disease Outbreaks through Specific Markers. *Genetika* **2024**, *56*, 169–185, doi:10.2298/GENSR2401169R.
10. Muthuramalingam, R.; Barroso, K.; Milagres, J.; Tedardi, V.; Franco De Oliveira, F.; Takeshita, V.; Karmous, I.; El-Tanbouly, R.; Da Silva, W. Tiny but Mighty: Nanoscale Materials in Plant Disease Management. *Plant Disease* **2024**, *108*, 241–255, doi:10.1094/PDIS-05-23-0970-FE.
11. Vidyasagar; Patel, R.R.; Singh, S.K.; Singh, M. Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Methods, Biological Applications, Delivery and Toxicity. *Mater. Adv.* **2023**, *4*, 1831–1849, doi:10.1039/D2MA01105K.
12. Gong, X.; Jadhav, N.D.; Lonikar, V.V.; Kulkarni, A.N.; Zhang, H.; Sankapal, B.R.; Ren, J.; Xu, B.B.; Pathan, H.M.; Ma, Y.; et al. An Overview of Green Synthesized Silver Nanoparticles towards Bioactive Antibacterial, Antimicrobial and Antifungal Applications. *Advances in Colloid and Interface Science* **2024**, *323*, 103053, doi:10.1016/j.cis.2023.103053.
13. Khan, Md.R.; Urmi, M.A.; Kamaraj, C.; Malafaia, G.; Ragavendran, C.; Rahman, Md.M. Green Synthesis of Silver Nanoparticles with Its Bioactivity, Toxicity and Environmental Applications: A Comprehensive Literature Review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management* **2023**, *20*, 100872, doi:10.1016/j.enmm.2023.100872.
14. Potbhare, A.K.; Chouke, P.B.; Mondal, A.; Thakare, R.U.; Mondal, S.; Chaudhary, R.G.; Rai, A.R. Rhizoctonia Solani Assisted Biosynthesis of Silver Nanoparticles for Antibacterial Assay. *Materials Today: Proceedings* **2020**, *29*, 939–945, doi:10.1016/j.matpr.2020.05.419.

15. Masum, Md.M.I.; Siddiqua, Mst.M.; Ali, K.A.; Zhang, Y.; Abdallah, Y.; Ibrahim, E.; Qiu, W.; Yan, C.; Li, B. Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles Using Phyllanthus Emblica Fruit Extract and Its Inhibitory Action Against the Pathogen Acidovorax Oryzae Strain RS-2 of Rice Bacterial Brown Stripe. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 820, doi:10.3389/fmicb.2019.00820.
16. Santiago, T.R.; Bonatto, C.C.; Rossato, M.; Lopes, C.A.P.; Lopes, C.A.; G Mizubuti, E.S.; Silva, L.P. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Tomato Leaf Extract and Their Entrapment in Chitosan Nanoparticles to Control Bacterial Wilt. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 4248–4259, doi:10.1002/jsfa.9656.
17. Silva, K.M.M.; Xavier, A.S.; Gama, M.A.S.; Lima, N.B.; Lyra, M.D.C.C.P.; Mariano, R.L.R.; Souza, E.B. Polyphasic Analysis of Acidovorax Citrulli Strains from Northeastern Brazil. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* **2016**, *73*, 252–259, doi:10.1590/0103-9016-2015-0088.
18. Pavia, D.L.; Lampman, G.M.; Kriz, G.S.; Vyvyan, J.R. *Introduction to Spectroscopy*; Fifth edition.; Cengage Learning: Stamford, CT, 2015; ISBN 978-1-285-46012-3.
19. Mehta, K.; Detchprohm, T.; Park, Y.J.; Liu, Y.-S.; Moreno, O.; Alugubelli, S.R.; Wang, S.; Ponce, F.A.; Shen, S.-C.; Dupuis, R.D.; et al. High Reflectivity Hybrid AlGaIn/Silver Distributed Bragg Reflectors for Use in the UV-Visible Spectrum. *IEEE J. Quantum Electron.* **2017**, *53*, 1–8, doi:10.1109/JQE.2017.2766288.
20. Trentin, D.D.S.; Giordani, R.B.; Zimmer, K.R.; Da Silva, A.G.; Da Silva, M.V.; Correia, M.T.D.S.; Baumvol, I.J.R.; Macedo, A.J. Potential of Medicinal Plants from the Brazilian Semi-Arid Region (Caatinga) against Staphylococcus Epidermidis Planktonic and Biofilm Lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *137*, 327–335, doi:10.1016/j.jep.2011.05.030.
21. Ravindran, C.; Naveenan, T.; Varatharajan, G.R.; Rajasabapathy, R.; Meena, R.M. Antioxidants in Mangrove Plants and Endophytic Fungal Associations. *Botanica Marina* **2012**, *55*, 269–279, doi:10.1515/bot-2011-0095.
22. Umme Ruman; Poonah Kia Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles from Bitter Melon (Momordica Charantia) Fruit and Seed Extract and Their Antimicrobial Activity. *JRNN* **2021**, *2*, 1–11, doi:10.37934/jrnn.2.1.111.
23. *Springer Handbook of Nanotechnology*; Bhushan, B., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007; ISBN 978-3-540-29855-7.
24. *Nanoparticles From Theory to Application*; 1., Auflage, neue Ausg.; Wiley-VCH: Weinheim, 2006; ISBN 978-3-527-60404-3.
25. Amendola, V.; Meneghetti, M. Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV–vis Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 4277–4285, doi:10.1021/jp8082425.
26. Smitha, S.L.; Nissamudeen, K.M.; Philip, D.; Gopchandran, K.G. Studies on Surface Plasmon Resonance and Photoluminescence of Silver Nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2008**, *71*, 186–190, doi:10.1016/j.saa.2007.12.002.
27. Yeshchenko, O.A.; Dmitruk, I.M.; Alexeenko, A.A.; Kotko, A.V.; Verdal, J.; Pinchuk, A.O. Size and Temperature Effects on the Surface Plasmon Resonance in Silver Nanoparticles. *Plasmonics* **2012**, *7*, 685–694, doi:10.1007/s11468-012-9359-z.
28. *Colloid Science: Principles, Methods and Applications*; Cosgrove, T., Ed.; 2nd ed.; Wiley: Chichester, West Sussex, 2010; ISBN 978-1-4443-2019-0.
29. Gaumet, M.; Vargas, A.; Gurny, R.; Delie, F. Nanoparticles for Drug Delivery: The Need for Precision in Reporting Particle Size Parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, *69*, 1–9, doi:10.1016/j.ejpb.2007.08.001.
30. Hinsch, J.J.; Liu, J.; White, J.J.; Wang, Y. The Role of Steps on Silver Nanoparticles in Electrocatalytic Oxygen Reduction. *Catalysts* **2022**, *12*, 576, doi:10.3390/catal12060576.

31. Chakravarty, A.; Ahmad, I.; Singh, P.; Ud Din Sheikh, M.; Aalam, G.; Sagadevan, S.; Ikram, S. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Fruits Extracts of Syzygium Cumini and Their Bioactivity. *Chemical Physics Letters* **2022**, *795*, 139493, doi:10.1016/j.cplett.2022.139493.
32. Nayab, D.-; Akhtar, S. Green Synthesized Silver Nanoparticles from Eucalyptus Leaves Can Enhance Shelf Life of Banana without Penetrating in Pulp. *PLoS ONE* **2023**, *18*, e0281675, doi:10.1371/journal.pone.0281675.
33. Kim, J.S.; Kuk, E.; Yu, K.N.; Kim, J.-H.; Park, S.J.; Lee, H.J.; Kim, S.H.; Park, Y.K.; Park, Y.H.; Hwang, C.-Y.; et al. Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2007**, *3*, 95–101, doi:10.1016/j.nano.2006.12.001.
34. Oves, M.; Khan, M.S.; Zaidi, A.; Ahmed, A.S.; Ahmed, F.; Ahmad, E.; Sherwani, A.; Owais, M.; Azam, A. Antibacterial and Cytotoxic Efficacy of Extracellular Silver Nanoparticles Biofabricated from Chromium Reducing Novel OS4 Strain of *Stenotrophomonas Maltophilia*. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e59140, doi:10.1371/journal.pone.0059140.
35. Elbeshehy, E.K.F.; Elazzazy, A.M.; Aggelis, G. Silver Nanoparticles Synthesis Mediated by New Isolates of *Bacillus* Spp., Nanoparticle Characterization and Their Activity against Bean Yellow Mosaic Virus and Human Pathogens. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, doi:10.3389/fmicb.2015.00453.
36. Aziz, N.; Pandey, R.; Barman, I.; Prasad, R. Leveraging the Attributes of *Mucor Hiemalis*-Derived Silver Nanoparticles for a Synergistic Broad-Spectrum Antimicrobial Platform. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.01984.
37. Zhang, Z.; Li, S.; Gu, X.; Li, J.; Lin, X. Biosynthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles by the Arctic Anti-Oxidative Bacterium *Paracoccus* Sp. Arc7-R13. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2019**, *47*, 1488–1495, doi:10.1080/21691401.2019.1601631.
38. Mathivanan, K.; Selva, R.; Chandirika, J.U.; Govindarajan, R.K.; Srinivasan, R.; Annadurai, G.; Duc, P.A. Biologically Synthesized Silver Nanoparticles against Pathogenic Bacteria: Synthesis, Calcination and Characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2019**, *22*, 101373, doi:10.1016/j.bcab.2019.101373.
39. Pal, S.; Tak, Y.K.; Song, J.M. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia Coli*. *Appl Environ Microbiol* **2007**, *73*, 1712–1720, doi:10.1128/AEM.02218-06.
40. Singh, S.; Singh, B.; Singh, A.P. Nematodes: A Threat to Sustainability of Agriculture. *Procedia Environmental Sciences* **2015**, *29*, 215–216, doi:10.1016/j.proenv.2015.07.270.
41. Burdman, S.; Walcott, R. *Acidovorax Citrulli* : Generating Basic and Applied Knowledge to Tackle a Global Threat to the Cucurbit Industry. *Molecular Plant Pathology* **2012**, *13*, 805–815, doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00810.x.
42. Bahar, O.; Goffer, T.; Burdman, S. Type IV Pili Are Required for Virulence, Twitching Motility, and Biofilm Formation of *Acidovorax Avenae* Subsp. *Citrulli*. *MPMI* **2009**, *22*, 909–920, doi:10.1094/MPMI-22-8-0909.
43. Bahar, O.; De La Fuente, L.; Burdman, S. Assessing Adhesion, Biofilm Formation and Motility of *Acidovorax Citrulli* Using Microfluidic Flow Chambers: Behavior of A. *Citrulli* in Microfluidic Flow Chambers. *FEMS Microbiology Letters* **2010**, *312*, 33–39, doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02094.x.
44. Qayyum, S.; Oves, M.; Khan, A.U. Obliteration of Bacterial Growth and Biofilm through ROS Generation by Facilely Synthesized Green Silver Nanoparticles. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0181363, doi:10.1371/journal.pone.0181363.

45. González, J.F.; Hahn, M.M.; Gunn, J.S. Chronic Biofilm-Based Infections: Skewing of the Immune Response. *Pathogens and Disease* **2018**, *76*, doi:10.1093/femspd/fty023.
46. Felifel, W.; Reda, F.; Hassanien, W. Biofilms Formation by Pathogenic Bacteria. Review. *Bulletin of Faculty of Science, Zagazig University* **2024**, *2023*, 66–73, doi:10.21608/bfszu.2023.194237.1250.
47. Liu, H.; Tian, W.-X.; Ibrahim, M.; Li, B.; Zhang, G.-Q.; Zhu, B.; Xie, G.-L. Characterization of pilP, a Gene Required for Twitching Motility, Pathogenicity, and Biofilm Formation of *Acidovorax Avenae* Subsp. *Avenae* RS-1. *Eur J Plant Pathol* **2012**, *134*, 551–560, doi:10.1007/s10658-012-0038-x.
48. Abdallah, Y.; Ali, E.F.; Abo-Elyousr, K.A.M.; Bagy, H.M.K. Biosynthesized Silver Nanoparticles Using Jojoba Oil as a Novel Antibacterial Agent for Controlling *Pectobacterium Carotovorum* in Potato. *Eur J Plant Pathol* **2024**, doi:10.1007/s10658-024-02902-4.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

1. A população de isolados brasileiros de *Paracidovorax citrulli* é constituída por isolados dos grupos I e II, com maior predominância dos isolados do grupo I, de acordo com análises filogenômicas;
2. As proteínas cas3 e cas10 estão presentes no genoma de todos os isolados brasileiros de *P. citrulli*, enquanto os plasmídios pAMC6 e pAC53 estão presentes apenas em três isolados da bactéria pertencentes ao grupo I;
3. A proteína efetora XopE/AvrPphe pode ser utilizada para diferenciar isolados brasileiros dos grupos I e II.
4. Este foi o primeiro relato de síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs) no controle de isolados brasileiros de *P. citrulli* e mostra a eficiência do extrato da folha de melão-de-são-Caetano (5 g folha.100 mL⁻¹) como fonte de AgNPs;
5. O uso de AgNPs afeta diretamente os fatores de patogenicidade, motilidade *swimming* e formação de biofilme de *P. citrulli*;
6. As concentrações de 225 µmol.L⁻¹ e 325 µmol.L⁻¹ de AgNPs apresentam potencial no controle de *P. citrulli* e devem ser testadas em condições de campo.