

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Silenciamento gênico pós-transcricional no controle de *Botrytis cinerea*

Luiz Filipe Bastos Mendes

Pelotas, 2021

Luiz Filipe Bastos Mendes

Silenciamento gênico pós-transcricional no controle de *Botrytis cinerea*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Vanessa Galli

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M538s Mendes, Luiz Filipe Bastos

Silenciamento gênico pós-transcricional no controle de *Botrytis cinerea* / Luiz Filipe Bastos Mendes ; Vanessa Galli, orientadora. — Pelotas, 2021.

103 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Fungos patogênicos. 2. miRNA. 3. circRNA. 4. PTGS. 5. Bioinformática. I. Galli, Vanessa, orient. II. Título.

CDD : 574.2326

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Luiz Filipe Bastos Mendes

Silenciamento gênico pós-transcricional no controle de *Botrytis cinerea*

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 9 de junho de 2021

Banca examinadora:

Prof^a Dr.^a Vanessa Galli (Orientadora)

Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Leandro José Dallagnol

Doutor em Fitopatologia pela Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Moisés João Zotti

Doutor em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas

MSc. Tatiane Jéssica Siebeneichler

Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho aos meus pais Rosa Maria e Fernando, e irmãos Luiz Fernando, Leonardo e Letícia.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer do fundo do meu coração aos meus pais, Fernando e Rosa Maria, por todo o carinho, apoio e sabedoria que me proveram ao longo dos anos. Amá-los com todo meu coração é um ato involuntário e, se tivesse escolha, escolheria os amar o tanto quanto fosse possível e buscaria maneiras de o fazer mais intensamente!

Aos meus irmãos, Luiz Fernando, Leonardo e Letícia, aos meus primos, Vitor, Lires e Mozart, e minha tia Tânia. Apesar da distância que mantemos durante maior parte da minha graduação, nunca esqueci de quanto gostaria de os ter por perto. Vocês são parte de mim, não importa o quão longe estejamos.

Agradeço imensamente a Tia Elza, Doris e Elza Maria. Jamais esquecerei o amor e carinho que recebi de vocês, desde o primeiro momento em que me receberam em sua casa. Moras com vocês durante esses 4 anos, foi como morar com minha própria família. Vocês são minha segunda família!

Meus agradecimentos aos meus amigos que fiz em Pelotas. Agradeço por todas as risadas, conversas, aprendizagens e momentos que vivenciamos juntos. Vocês certamente tornaram essa experiência muito melhor!

Gostaria também de agradecer a Professora Gabriele Ghisleni e a equipe do Laboratório de Neurociências Clínicas da UCPel. Agradeço imensamente pelas conversas, aprendizagens e oportunidades que compartilhamos ao longo desses 3 anos de Iniciação científica. Muito do meu desenvolvimento acadêmico e profissional é devido a vocês.

Agradeço a minha professora orientadora Vanessa Galli, não somente por ter me abraçado como orientado nesses momentos finais de graduação, como também me apoiado completamente em cada um dos passos que levaram a realização desse trabalho. O impacto que você teve em mim durante esse período tão curto é imenso!

Por último, gostaria de agradecer aos professores e funcionários do curso de graduação em Biotecnologia da UFPel pelas oportunidades e ensinamentos que me propuseram ao longo da graduação!

Resumo

MENDES, Luiz Filipe Bastos **Silenciamento gênico pós-transcricional no controle de *Botrytis cinerea***. 2021. 103f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Bacharelado em Biotecnologia – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

O *Botrytis cinerea*, agente etiológico do mofo cinzento, é um patógeno fúngico de grande importância econômica e científica, em razão das grandes perdas que causa nas mais diversas culturas agrícolas. Devido à sua grande adaptabilidade ao ambiente e hospedeiros e capacidade de originar linhagens resistentes aos métodos de controle atualmente utilizados, é necessário o desenvolvimento de novas estratégias para o combate a esse patógeno. A utilização de estratégias baseadas no silenciamento gênico pode ser uma alternativa na proteção de plantas contra o mofo cinzento, porém maior entendimento das moléculas associadas com esse mecanismo se faz necessário para sua aplicação efetiva e segura. O objetivo do presente trabalho foi elaborar uma revisão de literatura visando elucidar a utilização de metodologias baseadas em silenciamento gênico pós-transcricional, através de microRNAs e RNAs circulares, no controle de *Botrytis cinerea*. Os miRNAs e circRNAs são classes emergentes de RNAs endógenos não codificantes que atuam no silenciamento gênico. Estudos vem demonstrando, principalmente através de técnicas de bioinformática que essas moléculas apresentam expressão diferencial em resposta a estresses bióticos, porém o conhecimento sobre a biogênese, degradação e mecanismos por trás da sua atuação e como atuam em resposta a patógenos ainda está amadurecendo. Diversos estudos já demonstraram o uso bem sucedido de silenciamento gênico no controle de pragas fúngicas, porém até o momento nenhum trabalho demonstrou o uso de RNAs circulares para esse propósito. Assim, a compilação dos dados disponíveis na literatura, bem como a elucidação do papel de miRNAs e circRNAs na defesa vegetal contra patógenos é de grande importância para o desenvolvimento de metodologias transformativas e não transformativas baseadas neste processo, visando o controle de *B. cinerea*.

Palavras-chave: Fungos patogênicos; miRNA; circRNA; PTGS; bioinformática

Abstract

MENDES, Luiz Filipe Bastos. **Post-transcriptional gene silencing in the control of *Botrytis cinerea***. 2021. 103f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Bacharelado em Biotecnologia – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Botrytis cinerea, etiologic agent of gray mold, is a fungal pathogen of great economic and scientific importance, due to the great losses it causes in several agricultural crops. Due to its great adaptability to the environment and hosts, and its ability to originate strains resistant to the control methods currently used, the development of new strategies to combat this pathogen is necessary. The use of strategies based on gene silencing may be an alternative in the protection of plants against gray mold, but a better understanding of the molecules associated with this mechanism is necessary for its effective and safe application. The objective of the present work was to elaborate a literature review aiming to elucidate the use of methodologies based on post-transcriptional gene silencing, through microRNAs and circRNAs, in the control of *Botrytis cinerea*. The miRNAs and circRNAs are emerging classes of endogenous non-coding RNAs that act in gene silencing. Studies have shown, mainly through bioinformatics techniques, that these molecules show differential expression in response to biotic stresses, but the knowledge about the biogenesis, degradation and mechanisms behind their action and how they act in response to pathogens is still maturing. Several studies have already demonstrated the successful use of gene silencing in the control of fungal pests, however to date no work has demonstrated the use of circular RNAs for this purpose. Thus, the compilation of available data in the literature, as well as the elucidation of the role of miRNAs and circRNAs in plant defense against pathogens is of great importance for the development of transformative and non-transformative methodologies based on this process, aiming at the control of *B. cinerea*.

Key-words: Pathogenic fungi; miRNA; circRNA; PTGS; bioinformatics

Lista de Figuras

Figura 1 – Ciclo patológico assexual de <i>Botrytis cinerea</i> em morango.	23
Figura 2 - Foto do efeito de mofo cinzento em uva (<i>Vitis vinífera</i> 'Italia') em armazenamento frio.....	25
Figura 3 - Visão geral da biogênese do miRNA.	47
Figura 4 - Biogênese dos circRNAs.	55
Figura 5 - Mecanismos distintos de degradação de circRNAs.	58

Lista de Quadros

Quadro 1: Classificação taxonômica de <i>Botryotinia fuckeliana</i>	22
Quadro 2 - Modo de ação, grupo químico, exemplo e código FRAC dos principais fungicidas utilizados no controle de <i>B. cinerea</i>	41
Quadro 3 - Aplicação de métodos transformativos e não transformativos baseados em PTGS no controle de patógenos fúngicos.....	70

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADAR1	<i>Adenosine RNA acting on RNA 1</i>
AGO1	Argonauta 1
AGO10	Argonauta 10
AGO2	Argonauta 2
AGO4	Argonauta 4
AGO7	Argonauta 7
AMP1	<i>Altered Meristem Program 1</i>
ARF	<i>Auxin Response Factor</i>
ATP	Adenosina trifosfato
<i>Ave1</i>	Gene codificante para <i>Avirulence on Ve 1</i>
<i>Avra10</i>	<i>Avirulence gene</i>
<i>Bc-DCL1</i>	Gene codificante para <i>Dicer-like 1</i> de <i>Botrytis cinerea</i>
<i>Bc-DCL2</i>	Gene codificante para <i>Dicer-like 2</i> de <i>Botrytis cinerea</i>
BcNEP1	<i>Necrosis and ethylene-inducing peptide 1</i> de <i>Botrytis cinerea</i>
BcNEP2	<i>Necrosis and ethylene-inducing peptide 2</i> de <i>Botrytis cinerea</i>
BcNoxA	NADPH oxidase subunidade A de <i>Botrytis cinerea</i>
BcNoxB	NADPH oxidase subunidade B de <i>Botrytis cinerea</i>
BcNoxR	NADPH oxidase subunidade regulatória de <i>Botrytis cinerea</i>
BcPG1	Endopoligalacturonase 1 de <i>Botrytis cinerea</i>
BcPG2	Endopoligalacturonase 2 de <i>Botrytis cinerea</i>
BcSOD1	Cu-Zn-superoxido desmutase 1 de <i>Botrytis cinerea</i>
BcSp1	<i>SQUAMOSA-promoter binding protein-like</i> de <i>Botrytis cinerea</i>
CAZy	<i>Carbohydrate-Active Enzymes</i>
CDC5	<i>Cell Division Cycle 5</i>
CFME	<i>Carbon Fiber MicroElectrodes</i> (microelétrodos de fibras de carbono)
<i>Chs3b</i>	Gene codificante para <i>Chitin Synthase 3</i>
circRNA	<i>Circular RNA</i> (RNA circular)
ciRNA	<i>Intronic circRNAs</i> (circRNA intrônico)
Clp-1	<i>Ca²⁺-dependent cysteine protease</i>
CPL1	<i>C-terminal Domain Phosphatase-like 1</i>

<i>CYP51</i>	Gene codificante para <i>Cytochrome P450 lanosterol C-14α-demethylase</i>
<i>CYP51A</i>	Gene parólogo à <i>CYP51</i>
<i>CYP51B</i>	Gene parólogo à <i>CYP51</i>
<i>CYP51C</i>	Gene parólogo à <i>CYP51</i>
DCL1	<i>Dicer-like 1</i>
DCL2	<i>Dicer-like 2</i>
DCL3	<i>Dicer-like 3</i>
DCL4	<i>Dicer-like 4</i>
DCP1	<i>Decapping 1</i>
DCP1	<i>Decapping 2</i>
DHX9	<i>DExH-Box Helicase 9</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DRB1	<i>Double-stranded RNA-binding Protein 1</i>
DRB2	<i>Double-stranded RNA-binding Protein 2</i>
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i> (RNA de fita dupla)
ElciRNAs	Exon-intron circRNA
ELISA	<i>Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
<i>ERG11</i>	Gene codificante para <i>Cytochrome P450 lanosterol C-14α-demethylase</i>
<i>ERG6</i>	Gene codificante para <i>C-24 sterol methyltransferase</i>
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ETI	<i>Effector Triggered Immunity</i> (Imunidade Desencadeada Por Efetores)
EUA	Estados Unidos da América
<i>FcFgl1</i>	Gene codificante para uma lipase secretada de <i>Fusarium culmorum</i>
<i>FcFmk1</i>	Gene codificante para uma <i>Mitogen-activated protein kinase</i> de <i>Fusarium culmorum</i>
<i>FcGls1</i>	Gene codificante para <i>Glutaminase 1</i> de <i>Fusarium culmorum</i>
FRAC	<i>Fungicide Resistance Action Committee</i> (Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas)

G3BP1	<i>Ras-GTPase-activating SH3domain-binding protein 1</i>
HD-ZIP III	<i>Homeodomain leucine zipper III</i>
HEN1	<i>Hua Enhancer 1</i>
HESO1	<i>HEN Supressor 1</i>
HiC-15	<i>Isotrichodermin C-15 hydroxylase</i>
HIGS	<i>Host-induced gene silencing</i> (silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro)
HOS5	<i>High Osmotic Stress Gene Expression 5</i>
HSP90	<i>Heat Schock Protein 90</i>
HST	HASTY
HvSOD1	Cu-Zn-superoxido desmutase 1 de <i>Hordeum vulgare</i>
HYL1	<i>Hyponastic Leaves 1</i>
IGS	<i>Ribosomal intergenic spaces</i> (Espaço Ribossomal Intergênico)
ITS	<i>internal transcribed spacer</i> (Espaçador interno transcrito)
LINEs	<i>Long Interspersed Nuclear Elements</i>
LLERCPs	<i>LLEs complementary pairs</i>
LLEs	<i>LINE1-like elements</i>
lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i> (RNA longo não codificante)
m ⁷ G	Nucleosídeo 7-metilguanossina
MED37	<i>Mediator subunidade 37</i>
MIMV	<i>Maize Iranian mosaic vírus</i>
MIR	Gene codificante para miRNA
miRNA	Micro RNA
<i>Mla</i>	<i>Mildew resistance locus a</i>
MoABC1	Gene codificante para <i>ATP-binding cassette 1</i> de <i>Magnaporthe oryzae</i>
MoMAC1	Gene codificante para <i>Membrane-bound Adenylate Cyclase</i> de <i>Magnaporthe oryzae</i>
MoPMK	Gene codificante para <i>Mitogen-activated Protein Kinase</i> de <i>Magnaporthe oryzae</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
MRP	<i>Multidrug Resistance-Associated Protein 1</i>
MTA	mRNA adenosina metilase

<i>Myo5</i>	<i>Myosin 5</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ncRNA	<i>Non-coding RNA</i> (RNA não condificante)
<i>NLP1</i>	Gene codificante para <i>Necrosis and Ethylene inducing-like Protein 1</i>
NOT2	<i>Negative On TATA Less 2</i>
NOX	NADPH oxidase
NoxA	NADPH oxidase subunidade A
NoxB	NADPH oxidase subunidade B
NUP1	Nucleoporina 1
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> (padrões moleculares associados a patógenos)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação Em Cadeia Da Polimerase)
phasRNAs	<i>phased secondary small interfering RNAs</i>
PIRL	<i>Plant Intracellular Ras-group LRR</i>
PPR	<i>Pentatricopeptide repeat</i>
pre-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	miRNA primários
<i>PsCNA1</i>	Gene codificante para <i>CalciNeurin A 1</i> de <i>Puccinia striiformis</i>
<i>PsCNB1</i>	Gene codificante para <i>CalciNeurin B 1</i> de <i>Puccinia striiformis</i>
<i>PsCPK1</i>	Gene codificante para <i>Protein kinase A catalytic subunit</i> de <i>Puccinia striiformis</i>
<i>PstGSRE1</i>	Gene codificante para <i>Glycine-serine-rich effector 1</i> de <i>Puccinia striiformis</i>
<i>PtCNB</i>	Gene codificante para <i>CalciNeurin B 1</i> de <i>Puccinia striiformis</i>
<i>PtCYC1</i>	Gene codificante para <i>Cyclophilin 1</i> de <i>Puccinia triticina</i>
PTGS	<i>Post-transcriptional gene silencing</i> (Silenciamento Gênico Pós-Transcricional)
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i> (padrões moleculares associados a patógenos)
<i>PtMAPK1</i>	Gene codificante para <i>Mitogen-activated protein kinase 1</i> de <i>Puccinia triticina</i>

RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (DNA polimórfico amplificado ao acaso)
RBPs	<i>RNA-binding proteins</i>
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RH	Resposta hipersensível
RICE1	<i>RISC-interacting Clearing 3'-5' Exoribonuclease 1</i>
RICE2	<i>RISC-interacting Clearing 3'-5' Exoribonuclease 2</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RNAPII	RNA Polimerase II
RNase L	Ribonuclease L
RNase P	Ribonuclease P
RNase R	Ribonuclease R
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
<i>Rom1</i>	<i>Restoration of Mla resistance 1</i>
RPA	<i>Recombinase Polymerase Amplification</i> (Amplificação de DNA pela Polimerase Recombinase)
rRNA	RNA ribossômico
RRP6L	<i>Ribosomal RNA-Processing Protein 6-like</i>
RS40	<i>Arginine/Serine-Rich Splicing Factor 40</i>
RS41	<i>Arginine/Serine-Rich Splicing Factor 41</i>
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Region</i> (Região Amplificada de Sequência Caracterizada)
SDN1	<i>Small RNA Degrading Nuclease 1</i>
SDN2	<i>Small RNA Degrading Nuclease 2</i>
SE	<i>Serrate</i>
SERS	<i>Surface-Enhanced Raman Scattering</i> (Dispersão Raman Amplificada por Superfície)
<i>Sge1</i>	Gene codificante para <i>SIX Gene Expression 1</i>
SIGS	<i>Spray-induced gene silencing</i> (silenciamento gênico induzido por pulverização)
siRNA	<i>Small interfering RNA</i> (pequeno RNA interferente)

snRNP	<i>small nuclear Ribonucleoprotein particle</i>
SOD2	Cu-Zn-superoxido desmutase 2
SPAuE	<i>Screen-Printed Gold Electrodes</i> (Eletrodo Impresso de Ouro)
SPCE	<i>Screen-Printed Carbon Electrodes</i> (eletrodos impressos de carbono)
SPL	<i>SQUAMOSA-promoter binding protein-like</i>
sRNA	<i>Small RNA</i> (pequeno RNA)
TIR-NBS-LRR	<i>Toll/Interleukin-1 Receptor nucleotide-binding site-leucine-rich repeat</i>
TREX2	<i>Transcript Export 2</i>
TRN1	<i>Transportin 1</i>
tsRNA	<i>Transfer RNA-derived small RNA</i> (pequeno RNA derivado de RNA transportador)
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf cult virus</i>
UPF1	<i>Upstream Frameshift 1</i>
URT1	<i>UTP:RNA Uridyltransferase</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
UV	Ultravioleta
Vd-DCL1	<i>Dicer-like 1 de Verticillium dahlia</i>
Vd-DCL2	<i>Dicer-like 2 de Verticillium dahlia</i>
VIGS	<i>Virus-induced gene silencing</i> (silenciamento gênico induzido por vírus)
Xrn1	<i>5'-3' exoribonuclease 1</i>
Xyn11A	Endo- β -1,4-xilanase 11A

Sumário

1 Introdução	18
2 Objetivos	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 Métodos.....	20
4 Revisão bibliográfica	21
4.1 <i>Botrytis cinerea</i>	21
4.1.1 Patologia e fatores de virulência	22
4.1.2 Detecção de <i>Botrytis cinerea</i>	29
4.1.2.1 Métodos tradicionais.....	29
4.1.2.2 Detecção por análise espectral	30
4.1.2.3 Ensaio imunológicos.....	31
4.1.2.4 Ensaio moleculares	32
4.1.2.5 Biossensores	33
4.1.3 Métodos de controle de <i>Botrytis cinerea</i>	35
4.1.3.1 Práticas agrônomicas e hortícolas.....	35
4.1.3.2 Métodos físicos.....	36
4.1.3.3 Controle biológico.....	38
4.1.3.4 Métodos químicos	39
4.1.3.5 Controle de <i>Botrytis</i> baseado em silenciamento gênico.....	42
4.2 Silenciamento gênico pós-transcricional	43
4.2.1 miRNAs	44
4.2.1.1 Ciclo biológico de miRNAs	45
4.2.1.1.1 Biogênese de miRNAs e formação do RISC	45
4.2.1.1.2 Degradação de miRNAs.....	48
4.2.1.2 Modos de atuação	50
4.2.1.2.1 Clivagem de mRNA mediada por miRNA.....	51
4.2.1.2.2 Supressão de tradução mediada por miRNA	51
4.3 RNA circular	52
4.3.1 Ciclo biológico de circRNAs	53
4.3.2 Identificação e caracterização de circRNAs	58
4.3.3 Modos de atuação dos circRNAs em plantas.....	60

4.4 Silenciamento gênico em resposta a estresses bióticos	62
4.4.1 miRNAs na resposta a infecções fúngicas em plantas.....	62
4.4.2 CircRNAs na resposta a estresses bióticos.....	66
4.4.3 Uso de silenciamento gênico no controle de doenças fúngicas	68
4.4.4 Aspectos de segurança do uso agrícola de PTGS	74
5 Conclusões e perspectivas.....	76
Referências	78

1 Introdução

O *Botrytis cinerea*, agente etiológico de mofo cinzento, é um patógeno fúngico de grande importância econômica e científica, capaz de afetar diversas espécies vegetais, como uva, maçãs, tomates e morangos (DEAN et al., 2012; DROBY; LICHTER, 2007; ELAD et al., 2016). Devido ao seu grande repertório de fatores de virulência, alta adaptabilidade ao ambiente e hospedeiros, e grande plasticidade, levando ao surgimento rápido de linhagens resistentes a fungicidas e até mesmo a métodos de controle biológico, é um grande desafio atualmente o controle eficiente desse patógeno (FILLINGER; ELAD, 2016). O manejo de resistência do *B. cinerea* necessita de estratégias diversas e inovadoras para evitar o surgimento muito acelerado de linhagens resistentes aos fungicidas atualmente empregados. Nesse sentido, o controle através de metodologias baseadas no processo de silenciamento gênico pós-transcricional pode vir a se tornar uma alternativa viável (FILLINGER; WALKER, 2016; PETRASCH et al., 2019; ZOTTI et al., 2018).

O silenciamento gênico pós-transcricional é um mecanismo de controle da expressão gênica, governado por RNAs não codificantes (ncRNAs), com especial destaque para a classe dos microRNAs (miRNAs). Além disso, um novo grupo de ncRNAs, os RNAs circulares (circRNAs), tem despertado a atenção da comunidade científica quanto a seu papel no silenciamento gênico. Os mecanismos regulatórios dos miRNA e circRNAs ainda estão sendo elucidados e poucos trabalhos demonstram suas aplicações efetivas contra patógenos fúngicos; porém, podem ser amplamente explorados para regular mecanismos de defesa vegetal, bem como inativar mecanismos de resistência e fatores de virulência do patógeno e afetar seus processos celulares essenciais (ZOTTI et al., 2018). O conhecimento sobre esses mecanismos patogênicos, os métodos de controle atualmente empregados e como o silenciamento gênico pós-transcricional mediado por miRNAs e circRNAs atua de forma natural em resposta à infecção por *B. cinerea*, e por outros microrganismos patogênicos, pode auxiliar na utilização dessas moléculas de forma mais efetiva e segura no controle deste patógeno.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi elaborar uma revisão de literatura visando elucidar a utilização de metodologias baseadas em silenciamento gênico pós-transcricional, através de microRNAs e circRNAs, no controle de *Botrytis cinerea*.

2.2 Objetivos específicos

I) Investigar os principais mecanismos patogênicos e fatores de virulência utilizado pelo *Botrytis cinerea*;

II) Abordar os diferentes métodos de controle e identificação do *Botrytis cinerea* descritos na literatura.

III) Descrever os ciclos biológicos e modos de ação dos microRNAs e RNAs circulares, bem como a atuação dessas moléculas em plantas, em resposta a estresses bióticos;

IV) Contribuir para os avanços da utilização de métodos baseados em silenciamento gênico pós-transcricional no controle de *Botrytis cinerea*.

3 Métodos

Para a elaboração do presente trabalho foi realizada uma pesquisa em forma de revisão de literatura para coletar dados e informações científicas de artigos originais, artigos de revisão e livros voltados para o estudo de *Botrytis cinerea*. Para isso, foram utilizados os bancos de dados PubMed Central (NCBI) e a plataforma de busca Google Scholar. As palavras-chaves empregadas foram: *Botrytis cinerea*, *grey mold*, *micro RNA*, *miRNA*, *circRNAs*, *circular RNA*, *biotic stress*, *fungus pathogen*, *Post-transcriptional gene silencing*, *RNAi*, *interference RNA*.

4 Revisão bibliográfica

4.1 *Botrytis cinerea*

O *Botrytis cinerea* é um fungo fitopatogênico, agente etiológico do mofo cinzento ou podridão cinzenta, capaz de infectar mais de 1000 espécies de plantas, sendo considerado o segundo patógeno fúngico mais importante em níveis científico e econômico (DEAN et al., 2012; ELAD et al., 2016). Esse patógeno é encontrado mundialmente em diferentes órgãos vegetais como frutas, flores, folhas, raízes e brotos, podendo afetar diversas culturas de importância econômica como uva, maçã, limão, tomate, morango, brócolis, couve-flor, dentre outras, nas fases pré- e pós-colheita (DROBY; LICHTER, 2007). Além da gama de hospedeiros, sua importância pode ser explicada com fatores como: a sua habilidade de causar infecção quiescente; adaptabilidade a diferentes ambientes; a plasticidade genética e adaptabilidade a fungicidas; a falta de resistência por parte do hospedeiro; e estilo de vida flexível (CARISSE, 2016). Segundo Dean et al. (2012), os gastos mundiais no controle do mofo cinzento podem passar facilmente de 1 bilhão de euros por ano.

Dentre os patógenos fúngicos, o *B. cinerea* é considerado um dos principais patógenos de morangos, causando mofo cinzento em frutas e órgãos senescentes, mas podendo afetar também órgãos vegetativos (PETRASCH et al., 2019). Sob condições úmidas, mais de 80% de folhas e frutas de morangos podem ser perdidas, caso não seja aplicado fungicida nas plantas (RIES, 1995).

O *B. cinerea* é a fase assexual (anamórfica) do fungo teleomorfo *Botryotinia fuckeliana*, cuja classificação se encontra no Quadro 1 (ROMANAZZI; FELIZIANI, 2014). O gênero *Botrytis* inclui 35 espécies, dos quais todos interagem com plantas (GARFINKEL et al., 2017; HYDE et al., 2014; VALERO-JIMÉNEZ et al., 2019). Com exceção de uma das espécies, as demais são patógenos com comportamento necrotrófico, o que significa que eles infectam e crescem em tecidos danificados ou senescentes com o objetivo de adquirir nutrientes, eventualmente causando a morte do tecido (PETRASCH et al., 2019; VALERO-JIMÉNEZ et al., 2019). Enquanto a maioria das espécies desse gênero estão limitadas a uma única espécie vegetal alvo, ou um pequeno número de

hospedeiros taxonomicamente relacionados, o *B. cinerea* e *B. pseudocinerea*, que são indistinguíveis morfologicamente, são os únicos capazes de causar mofo cinzento em uma ampla gama de hospedeiros (ELAD et al., 2016; STAATS; VAN BAARLEN; VAN KAN, 2005; VALERO-JIMÉNEZ et al., 2019).

Quadro 1: Classificação taxonômica de *Botryotinia fuckeliana*

Super-reino	Eukaryota
Reino	Fungi
Sub-reino	Dikarya
Filo	Ascomycota
Subfilo	Pezizomycotina
Classe	Leotiomycetes
Ordem	Helotiales
Família	Sclerotiniaceae
Gênero	<i>Botryotinia</i>

Adaptado de: Romanazzi; Feliziani, 2014

O micélio do *B. cinerea* é ramificado, septado e de característica hialina a marrom (ROMANAZZI; FELIZIANI, 2014). Os conidiósporos, que surgem diretamente dos micélios ou do esclerócio, são altos, esbeltos, irregularmente ramificados na porção terminal, com células apicais aumentadas ou arredondadas, com grupos de conídios em dentículos curtos (ROMANAZZI; FELIZIANI, 2014). Os conídios são lisos, hialinos ou cinzentos, em forma de ovo, com comprimento médio de 10 µm e largura média de 5 µm (BARNETT; HUNTER, 1998; BŁASZKOWSKI et al., 2005). Os esclerócitos, que estão frequentemente presentes, são formados a partir de ramos miceliais que se fundem para formar uma massa globular, que inicialmente é hialina, mas depois se torna marrom ou preta devido à deposição de pigmentos melânicos na porção externa (ROMANAZZI; FELIZIANI, 2014). Clamidósporos são formados pela transformação de partes vegetativas do micélio e são liberados por desintegração de hifas (HOLZ; COERTZE; WILLIAMSON, 2007).

4.1.1 Patologia e fatores de virulência

Como mencionado previamente, o *B. cinerea* é um patógeno necrotrófico que mata as células do tecido infectado, com o objetivo de obter nutrientes do conteúdo intracelular (PETRASCH et al., 2019; VALERO-JIMÉNEZ et al., 2019). O processo infeccioso se inicia majoritariamente com a entrada no hospedeiro

através de feridas ou aberturas naturais em tecidos. A infecção de tecidos não senescentes ou de órgãos vegetais imaturos normalmente resulta em danos limitados e infecções quiescentes, antes de degradar rapidamente os tecidos, que ocorre quando o ambiente e a fisiologia do hospedeiro forem adequados para o desenvolvimento da doença ((MOLLY); GRANT-DOWNTON, 2016; WILLIAMSON et al., 2007). Em morangos, o mofo cinzento pode ocorrer através da infecção por *B. cinerea* de flores abertas ou pela penetração do patógeno em tecidos do receptáculo floral, em processos denominados infecção primária e infecção secundária, respectivamente (ver Figura 1) (BRISTOW; MCNICOL; WILLIAMSON, 1986). Enquanto na infecção secundária, o fungo inicia a fase necrotrófica sem passar por quiescência; na infecção primária, o patógeno infecta os órgãos florais durante ou logo após o florescimento, permitindo que a hifa cresça em direção ao receptáculo e então iniciando o período assintomático (HOLZ; COERTZE; WILLIAMSON, 2007; PETRASCH et al., 2019).

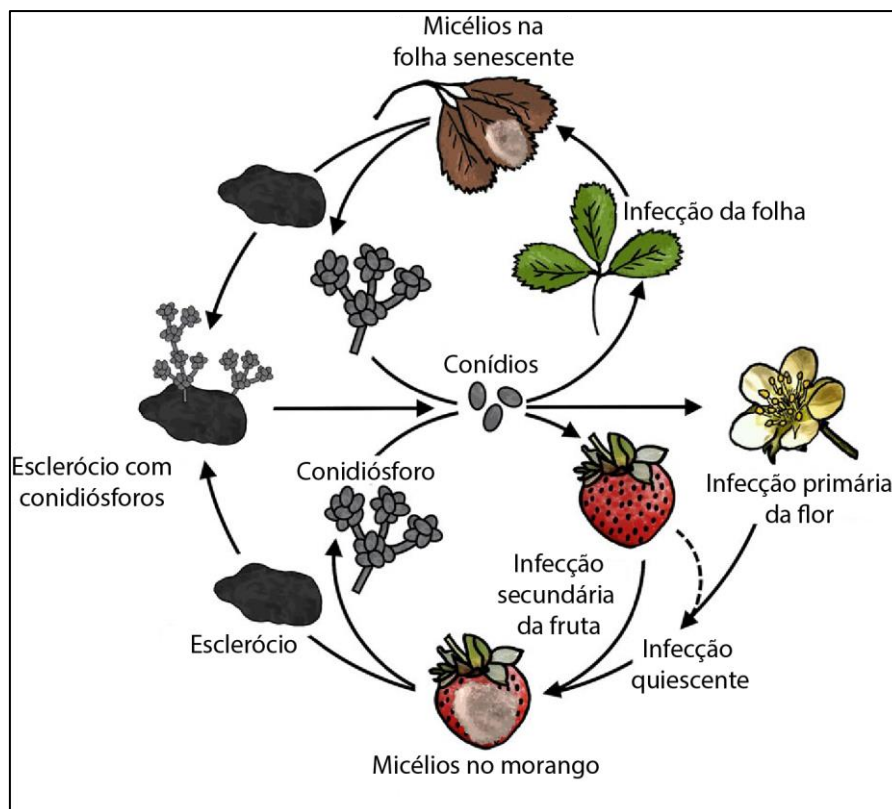


Figura 1 – Ciclo patogênico assexual de *Botrytis cinerea* em morango. A fonte inoculadora de *B. cinerea* inclui folhas e esclerócios. Infecção primária de flores e infecção secundária de frutos estão representadas. Adaptado de: Petrasch et al., 2019.

É interessante mencionar também que o *B. cinerea* apresenta um ciclo sexual, que, apesar de raramente observado na natureza, está relacionado com a sua diversidade genética dentre as populações deste patógeno (FILLINGER; ELAD, 2016). Os microconídios, que podem ser produzidos a partir do desenvolvimento pós-germinação de macroconídios ou formação endógena e hifas, “fertilizam” estruturas receptivas do esclerócio, induzido a produção das estruturas sexuais denominadas apotécios, onde ascos são gerados, cada um contendo oito ascósporos binucleados, que poderão iniciar o processo de infecção da planta hospedeira (CARISSE, 2016; (MOLLY); GRANT-DOWNTON, 2016).

Como na maioria das doenças fúngicas, o inóculo é um componente chave no desenvolvimento de mofo cinzento, pois a fonte do inóculo, quantidade e tipo influenciam o começo da epidemia, a taxa de progresso da doença e, indiretamente, as perdas de produção (CARISSE, 2016). O inóculo primário pode ser originário de conídios provenientes de esclerócitos que sobreviveram ao período entre cultivos ou diretamente do micélio de plantas próximas infectadas (JARVIS, 1962). O inóculo secundário por sua vez é produzido como resultado do processo de infecção inicial, a partir da conidiação após o processo de colonização (CARISSE, 2016). Além do inóculo, existem diversos outros fatores bióticos e abióticos associados com a agressividade do *B. cinerea*. A germinação dos conídios é influenciada pela presença de água livre na superfície ou alta umidade relativa, que são essenciais para a germinação e penetração, bem como a duração de irrigação (CARISSE, 2016). Esse patógeno é capaz de se desenvolver bem em temperaturas entre 0°C e 30°C, porém sua temperatura ótima de crescimento aparenta variar conforme o trabalho, podendo ser descrita entre 15-20°C, 15-25°C e até mesmo 25°C e 28°C (BULGER; ELLIS; MADDEN, 1987; CARISSE, 2016; MALTA, 2017). Além disso, a espécie vegetal infectada, bem como as condições bioquímicas do tecido também influenciam no crescimento do fungo, podendo também estar associado com as variações em condições ótimas de crescimento.

Os sintomas apresentados pela infecção por *B. cinerea* podem variar nos diferentes hospedeiros e até em um mesmo hospedeiro, sob diferentes condições climáticas (MORANDI; MAFFIA, 2005). A descrição mais comum

desses sintomas seria o desenvolvimento de podridão mole, caracterizada pelo aspecto úmido e necrótico das lesões acompanhado pelo colapso do tecido parenquimatoso, seguido pelo aparecimento rápido de massa cinzenta, decorrente do crescimento de micélio, conídios e conidióforos (ver Figura 2) (TÖFOLI et al., 2011; WILLIAMSON et al., 2007).



Figura 2 - Foto do efeito de mofo cinzento em uva (*Vitis vinífera* 'Italia') em armazenamento frio. Extraído de: Ahmed et al., 2018.

Os mecanismos associados à quiescência pós-infecção do receptáculo imaturo ainda não estão completamente elucidados. Estudos indicam que o acúmulo de proantocianidinas, antocianinas e compostos fenólicos pode estar associado com o manutenção da fase assintomática da infecção (JERSCH et al., 1989; PRUSKY; LICHTER, 2007; VAN BAARLEN; LEGENDRE; VAN KAN, 2007). Outros fatores ambientais na fruta não madura podem estar associados com a fase silenciosa, como a falta de nutrientes facilmente acessíveis, como açúcares mono e dissacarídeos, presença de outros compostos antifúngicos e presença de inibidores de fatores de virulência do *B. cinerea* (PRUSKY; LICHTER, 2007). As mudanças bioquímicas associadas com a maturação do morango, como aumento do conteúdo de açúcares, modificações na parede celular, alterações na cutícula, produção de compostos voláteis e alteração na

defesa das plantas, podem atuar na indução da fase sintomática e aumento da susceptibilidade da planta (HÉBERT et al., 2002; KNEE; SARGENT; OSBORNE, 1977; MEHLI et al., 2005; PETRASCH et al., 2019; TERRY et al., 2004). O *B. cinerea* é capaz de promover ativamente a susceptibilidade da planta através de diversos fatores de virulência, capazes de afetar diversas estruturas e o metabolismo das células vegetais (PETRASCH et al., 2019).

Nas fases iniciais de infecção, plantas normalmente geram grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs), como radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ozônio (O_3), de forma transiente em respostas hipersensíveis (RH) para responder a um patógeno invasivo. Porém, o *B. cinerea* pode utilizar esse sistema a seu favor e produzir EROs no processo patológico para a promoção de morte celular programada (GOVRIN; LEVINE, 2000; HUA et al., 2018; MELLERSH et al., 2002; TIAN; QIN; LI, 2013). Alguns fatores de virulência secretados como proteínas, toxinas e enzimas estão associadas com a produção de EROs (PETRASCH et al., 2019; SCHUMACHER, 2016). Foi demonstrado que não somente o crescimento do *B. cinerea* foi reduzido em plantas deficientes de RH, como o crescimento foi aumentado em plantas que foram estimuladas com bactéria não virulenta indutora de RH (GOVRIN; LEVINE, 2000). Govrin et al. (2006) demonstrou que a infiltração de fluido intercelular livre de células, extraído de folhas infectadas com *B. cinerea*, foi capaz de induzir a produção de EROs, bem como aumentar a virulência do patógeno; porém, não foi identificado se esse efeito foi causado devido à secreção de moléculas no fluido produzidas pelo fungo ou pela planta infectada. Quase todos os estudos de secretoma de *B. cinerea* identificaram a presença de uma proteína pertencente à família ceratoplatanina, chamada BcSp11 (GONZÁLEZ; BRITO; SHARON, 2016). Essas proteínas expressas de forma exógena causam necrose forte e rápida quando infiltradas em folhas, levando à indução de genes de defesa e sintomas de RH, enquanto linhagens deficientes dessa proteína apresentaram menor virulência (FRÍAS; GONZÁLEZ; BRITO, 2011; GONZÁLEZ; BRITO; SHARON, 2016). A infiltração com as proteínas BcNEP1 e BcNEP2, da família de proteínas *Necrosis and ethylene-inducing peptide 1* (Nep1)-like proteins são capazes de induzir a síntese de etileno e necrose em folhas, bem como outros representantes dessa

família são capazes de induzir acúmulo de EROs e indução de genes de defesa (ARENAS et al., 2010; GIJZEN; NÜRNBERGER, 2006). Esses estudos, em concordância com outros, demonstra que esse fungo necessita da RH para atingir seu potencial patogênico completo.

A geração de EROs por parte do *B. cinerea* pode ser gerado como parte do processo metabólico normal na mitocôndria, peroxissomos, citocromo P-450, e outros componentes celulares, ou como produto da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (NOX) (LI et al., 2016). A NOX é um complexo com multisubunidades, sendo que em fungos normalmente são identificadas duas subunidades catalíticas, NoxA e NoxB. Ambas BcNoxA e BcNoxB são necessárias para a formação de esclerócio; porém, nenhuma é necessária para a germinação de ascósporos (SEGMÜLLER et al., 2008). Enquanto a BcNoxB é necessária para a formação de estrutura de penetração, a BcNoxA é necessária para o crescimento de hifa após a infecção (SEGMÜLLER et al., 2008). A deleção da subunidade regulatório, BcNoxR, demonstrou menor taxa de crescimento, esporulação e diminuição da virulência, similar ao efeito da deleção das subunidades A e B (LI et al., 2016). Porém, não foi observado alterações nos níveis de EROs nesses mutantes, o que indica que EROs derivados de BcNox são necessários para a sinalização e diferenciação (SIEGMUND; VIEFHUES, 2016). Foi identificado no secretoma de *B. cinerea* a proteína Cu-Zn-superoxido desmutase 1 (BcSOD1), que é reconhecida como um fator de virulência (ROLKE et al., 2004). Proteínas dessa família convertem radical ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, porém não se sabe se essa proteína está atuando na detoxificação de EROs para proteção do fungo ou para contribuir no processo de infecção, ou ambos (GONZÁLEZ; BRITO; SHARON, 2016)

O *B. cinerea* secreta diversas enzimas degradadoras de parede celular para degradar os polissacarídeos estruturais da parede celular do hospedeiro, como celulose, hemicelulose e pectinas (AMSELEM et al., 2011; HUA et al., 2018). O processo de degradação da parede celular, não somente facilita a penetração na célula, como também libera açúcares para suprir as necessidades energéticas do patógeno (FILLINGER; ELAD, 2016). Foram preditas 1155 proteínas *Carbohydrate-Active Enzymes* (CAZy) no genoma de *B. cinerea*, das

quais 275 apresentam peptídeo sinal de secreção (AMSELEM et al., 2011; BLANCO-ULATE et al., 2014). A maioria dessas proteínas são hidrolases de ligações glicosídicas, que incluem poligalacturonases, e proteínas ligantes de carboidratos. O restante inclui esterases de carboidratos, transferases de grupos glicosil, e liases de polissacarídeos, em ordem de abundância. Apesar da grande gama de genes codificantes para essas enzimas presentes no genoma do *Botrytis*, há uma grande taxa de redundância entre elas e muitas não são essenciais para a virulência, porém certamente auxiliam na patologia (AMSELEM et al., 2011; HUA et al., 2018). Essas proteínas podem prover adaptações para diferentes tecidos do hospedeiro e estágios de infecção, assim possibilitando ajustes nas estratégias de virulência para cada hospedeiro (BLANCO-ULATE et al., 2014, 2016). As endopoligalacturonases de *B. cinerea*, BcPG1 e BcPG2, estão associadas com a virulência, sendo a primeira necessária para colonização em maçãs e em folhas e frutas de tomate, enquanto a segunda é necessária para infecção primária e expansão de lesões em tomate e fava (KARS et al., 2005; TEN HAVE et al., 1998). Foi demonstrado que a secreção de endo- β -1,4-xilanase 11A (Xyn11A) é necessária para a virulência completa do *B. cinerea*; porém sua atividade necrótica é independente da atividade de xilanases, visto que a infiltração da proteína mutante, sem capacidade de degradação de xilano, no local de infecção foi capaz de restaurar o fenótipo selvagem do fungo deficiente dessa enzima (BRITO; ESPINO; GONZÁLEZ, 2006; NODA; BRITO; GONZÁLEZ, 2010).

É importante mencionar também que o *B. cinerea* conta com diferentes metabólitos secundários que atuam como fatores de virulência, além de moléculas que promovem vantagem seletiva frente a estressores bióticos e abióticos (COLLADO; VIAUD, 2016). Os terpenos *botrydial* e compostos relacionados são importantes fatores de virulência que apresentam alta fitotoxicidade (COLMENARES et al., 2002). Ainda não se sabe qual é o mecanismo de ação do *botrydial*, porém foi proposto que ele é capaz de induzir RH através das vias de sinalização do ácido salicílico e do ácido jasmônico (ROSSI et al., 2011). Outro grupo importante de metabólitos secundários é formado pelos policetídeos *botcinic acid*, *botcinins* e *botrylactone* (COLLADO; VIAUD, 2016). O *botcinic acid* e seus derivados não somente possuem efeito

antifúngico contra *Magnaporthe grisea*, como também apresentam fitotoxicidade em dicotiledôneas e monocotiledôneas de forma redundante com o *botrydial* (CUTLER et al., 1993, 1996; DALMAIS et al., 2011; TANI et al., 2005). O *B. cinerea* é capaz de produzir o fitohormônio ácido abscísico e moléculas relacionadas, uma molécula considerada reguladora negativa de respostas de defesa, o que pode indicar a manipulação do metabolismo do hospedeiro (COLLADO; VIAUD, 2016; MARUMO et al., 1982; MAUCH-MANI; MAUCH, 2005; WANG; ZHOU; TAN, 2008). O ácido oxálico é um importante fator de virulência nesse patógeno, atuando de diversas formas, como reduzindo o pH para aumentar a atividade de hidrolases extracelulares; facilitando a degradação das camadas de pectina através do sequestro de íons Ca^{2+} ; e promovendo a morte celular programada (KIM; MIN; DICKMAN, 2008; VERHOEFF et al., 1988).

4.1.2 Detecção de *Botrytis cinerea*

A detecção prematura, rápida e precisa de patógenos quando o inóculo está em níveis suficientes para causar uma epidemia, pode evitar grandes custos econômicos e ambientais, levando menores perdas de produtos e menor quantidade de fungicidas utilizado (BILKISS; SHIDDIKY; FORD, 2019). Enquanto os métodos tradicionais permitem o diagnóstico em fase sintomática, as metodologias de análise espectral, imunológicas, moleculares e o uso de biossensores permitem o diagnóstico mais rápido e preciso do patógeno.

4.1.2.1 Métodos tradicionais

Tradicionalmente, a detecção de fitopatologias fúngicas é realizada através de inspeção visual dos sintomas como manchas, podridão, deformações, análises histopatológicas e/ou inspeção das características do patógeno, como morfologia, taxa de crescimento em cultura e cor das colônias; porém ambos métodos são dependentes do julgamento do observador (DEWEY; YOHALEM, 2007; RAY et al., 2017; TAYLOR; FORD, 2007). Enquanto as fases tardias de infecção por *B. cinerea* são facilmente reconhecidas devido ao crescimento de estrutura conidial cinza e/ou marrom na superfície do tecido

infectado, as fases iniciais ou quiescente são difíceis de detectar em materiais assintomáticos (MOLLY; GRANT-DOWNTON, 2016). A esterilização da superfície, seguido do congelamento do tecido ou fruto por 2 horas a -12°C, ou submersão em 300µg/mL de paraquat e então secagem por ar e incubação em atmosfera úmida em papel filtro ou meio seletivo por 7 a 10 dias, tem sido utilizado para detecção de infecções assintomáticas (EDWARDS; SEDDON, 2001; KERSSIES, 1990; (MOLLY); GRANT-DOWNTON, 2016; SANZANI et al., 2012).

4.1.2.2 Detecção por análise espectral

Doenças fúngicas são capazes de alterar a morfologia e características bioquímicas do tecido infectado, assim alterando as propriedades óticas do mesmo, que podem ser detectados por análise de dados espectrais (WU et al., 2008). Dessa forma, métodos de imageamento permitem a detecção relativamente rápida da presença do fungo em tecidos homogeneizados ou inteiros. A mensuração de autofluorescência, usando a proporção de fluorescência dos comprimentos de onda 440nm e 740nm de uvas infectadas permitiu a detecção da infecção 4 dias após a inoculação (BÉLANGER et al., 2011). A utilização de Espectrometria na Luz Visível e no Infravermelho Próximo permitiu a detecção precoce de *B. cinerea* em folhas inteiras destacadas de berinjela com acurácia de 85% (WU et al., 2008). Técnicas como Espectrometria no Infravermelho Próximo e Espectrometria no Infravermelho Médio permitem a detecção de *Botrytis* spp. em uvas homogeneizadas, porém os autores indicam que são necessárias melhorias na calibração para aumentar a acurácia do modelo (HILL et al., 2013). A utilização de câmera multiespectral portátil de cinco lentes, para visualização da refletância espectral de azul, verde, vermelho, infravermelho próximo (840nm) e *rededge* (720nm) permitiu a identificação a partir de 9 horas após inoculação (FAHRENTAPP et al., 2019). Scarboro et al. (2021) utilizou sistema de câmera dupla com dois filtros passa-faixa para os comprimentos de ondas 540nm e 670nm para detecção de *B. cinerea* em folhas de alface destacadas, e obteve 95,25% de positivo verdadeiro e 9,31% de falso positivo em condições de laboratório. Essas metodologias, apesar de

promissoras, apresentam como desvantagem as possíveis interferências por parte das variáveis, como luminosidade, ângulo da captura de imagem, dentre outros, assim dificultando sua aplicação. Além disso, as variações nos tecidos vegetais apresentam características muito similares entre diferentes tipos de estressores, podendo dificultar a determinação do agente específico em atuação. Vale mencionar que nenhum dos experimentos com imageamento aqui citados utilizaram outros patógenos como forma de controle, o que poderia ser interessante para determinar a especificidade dos modelos. O desenvolvimento de dispositivos portáteis, bem como a melhora dos modelos para melhor adaptação a condições ambientais e características de tecidos específicos é possível, o que tornariam essas tecnologias mais adequadas para aplicação a campo.

4.1.2.3 Ensaio imunológico

Ensaio imunológico permitem detecção de antígenos específicos expressos por patógenos e nesse sentido diversos ensaios foram desenvolvidos para a identificação de *B. cinerea*, sendo o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA- do inglês, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays*) o método comumente utilizado (DEWEY; YOHALEM, 2007). O desenvolvimento do anticorpo monoclonal BC-12.CA4, que reconhece todas as espécies de *Botrytis* e membros do gênero relacionado *Sclerotinia*, levou ao desenvolvimento de diversos ensaios imunológicos para detecção e quantificação de antígenos de *Botrytis* spp. em peras, morangos, uvas, dentre outros (BILKISS; SHIDDIKY; FORD, 2019; MEHLI et al., 2005; MEYER; SPOTTS; DEWEY, 2000; (MOLLY); GRANT-DOWNTON, 2016; OBANOR et al., 2004). Este anticorpo foi então utilizado por Fernández-Baldo et al. (2009) para o desenvolvimento de um imunossensor baseado em nanotubos de carbono em um sistema de fluxo contínuo com limite de detecção de 0,02µg/mL. No ano seguinte, esse sistema foi modificado por Fernández-Baldo et al. (2010) com a incorporação de *beads* micromagnéticas associadas a eletrodos impressos de carbono (SPCE- do inglês *Screen-Printed Carbon Electrodes*), levando a um limite de detecção de 0,008µg/mL de antígenos purificados de *Botrytis*. Um protocolo de ELISA

competitivo desenvolvido por Fernández-Baldo et al. (2011) possibilitou a identificação de antígenos de *Botrytis* spp. em tecidos de maçã, peras e uvas com limite de detecção de 0,97µg/mL em 40 min. Em todos os testes desenvolvidos que utilizam esse anticorpo, é necessário a diluição do extrato de tecidos infectados para evitar a ligação não específica de açúcares e otimizar a sensibilidade do teste; porém, independentemente do nível de otimização, devido às características do BC-12-CA4, o mesmo não é capaz de discriminar entre patógenos da espécie *Botrytis* (BILKISS; SHIDDIKY; FORD, 2019; (MOLLY); GRANT-DOWNTON, 2016).

4.1.2.4 Ensaios moleculares

Os métodos moleculares de detecção, por sua vez, possibilitam a identificação de material genético derivado do patógeno fúngico específico. Porém, estudos demonstram que as amostras devem ser bem controladas e que a padronização de protocolos de extração de DNA de alta qualidade e a manipulação da amostra para evitar contaminações são de suma importância para a reprodutibilidade dos resultados ((MOLLY); GRANT-DOWNTON, 2016). Diversos alvos genéticos já foram descritos para a detecção de *B. cinerea*, como as regiões *ribosomal intergenic spaces* (IGS) e *internal transcribed spacer* (ITS), os genes *actina*, *β-tubulina*, *cutinase A* e *RNA helicase*, além de marcadores de região amplificada de sequência caracterizada (SCAR- do inglês, *Sequence Characterized Amplified Region*) (BROUWER et al., 2003; CELIK et al., 2009; FAN et al., 2014; GACHON; SAINDRENAN, 2004; SUAREZ et al., 2005). Rigotti et al. (2002) desenvolveu os *primers* C₇₂₉⁺ e C₇₂₉⁻ a partir de um marcador de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD- do inglês, *Random Amplified Polymorphic DNA*) para detecção de *B. cinerea* por reação em cadeia da polimerase (PCR- do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), seguido de eletroforese, resultando em um limite de detecção de 0,2 pg. Nesse estudo, bem como ocorre com diversos outros marcadores genéticos, como a *cutinase A* e *β-tubulina*, ocorreu a amplificação de DNA de *B. fabae*, um relativo próximo do *B. cinerea* (BILKISS; SHIDDIKY; FORD, 2019; RIGOTTI et al., 2002; SUAREZ et al., 2005). Diguta et al. (2010) desenvolveu um protocolo de PCR em tempo real

para identificação e quantificação de *B. cinerea*, utilizando como base sequências IGS, possuindo limite de detecção de 6,3 pg. Fan et al. (2015) por sua vez utilizou 3 pares de *primers* Bc-f/Bc-r, Bfa-f/Bfa-r, and Bfab-f/Bfab-r, para o gene *NEP1*, com o objetivo de diferenciar *B. cinerea* de *B. fabae* e *B. fabiopsis* em fava. Esses demonstraram amplificação espécie-específica tanto em PCR simples quanto multiplex, resultando em limites de detecção de 40, 40, 400 pg de DNA genômico purificado, respectivamente; além disso, o PCR multiplex foi capaz de detectar os três *Botrytis* spp. em folhas de fava artificialmente e naturalmente infectadas (BILKISS; SHIDDIKY; FORD, 2019; FAN et al., 2014). A técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) possibilita a amplificação de DNA de forma portátil, altamente sensível e específica, e relativamente simples e barata, além de possibilitar a visualização do produto a olho nu, permitindo assim maior usabilidade. Tomlinson et al. (2010) desenvolveu um protocolo de LAMP com alvo em IGS com limite de detecção de 6,5 pg utilizando azul de hidroxinaftol. Duan et al. (2014) por sua vez utilizou o gene *Bcos5* como marcador e azul de hidroxinaftol, resultando em limite de detecção de 1 pg. Os métodos moleculares apesar de demonstrarem grandes vantagens, como rapidez, alta sensibilidade e especificidade, os mesmos ainda apresentam riscos de ocorrer reações cruzadas, além de falsos negativos associados com a baixa concentração de DNA fúngico em fases iniciais da infecção (BILKISS; SHIDDIKY; FORD, 2019).

4.1.2.5 Biossensores

Uma das tecnologias mais promissoras no desenvolvimento de dispositivos diagnósticos de doenças humanas e vegetais, incluindo a detecção e quantificação de *Botrytis* spp. são os biossensores. Newman et al. (2004) os definem como “um dispositivo analítico compacto incorporando um elemento sensor biológico ou derivado biologicamente integrado dentro ou intimamente associado a um transdutor físico-químico” (MASCINI; TOMBELLI, 2008). Essencialmente, biossensores devem ser altamente específicos, independentes de parâmetros físicos como pH e temperatura, bem como ser reutilizáveis (MEHROTRA, 2016). Essas características demonstram o grande potencial

desses dispositivos, porém poucos são os projetos e estudos publicados que utilizam biossensores na detecção de *B. cinerea*. Em sua tese de PhD, Binder (2014) desenvolveu um imunossensor eletroquímico utilizando eletrodo impresso de ouro (SPAuE, do inglês *Screen-Printed Gold Electrodes*) funcionalizado com peroxidase de raiz-forte que foi capaz de detectar 34ng/mL de micélio fúngico de *B. cinerea* e *B. allii* em folhas de cebola, podendo ser utilizado para detecção pré-sintomática no controle pré e pós-colheita. Cinquanta et al. (2015) desenvolveu por sua vez um biossensor amperométrico de eletrodo impresso de carbono para quantificação de ácido glucônico e glicerol em uvas, metabólitos secundários que aumentam conforme a progressão da infecção por *B. cinerea*. As menores concentrações que o sistema foi capaz de mensurar foram 3mg/L para ácido glucônico e 35mg/L para glicerol (CINQUANTA et al., 2015). Wee et al. (2015) desenvolveu um novo ensaio qualitativo de floculação em ponte mediada por amplificação isotérmica de DNA pela polimerase recombinase (RPA- do inglês *Recombinase Polymerase Amplification*), que utiliza esferas magnéticas capazes de se ligar reversivelmente a moléculas de DNA de forma dependente de pH. O método, que pode ser realizado fora do ambiente de laboratório, permitiu a detecção a olho nu de *B. cinerea*, *Pseudomonas syringae* e *Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans* em extrato de folhas de *Arabidopsis thaliana* quando os sintomas das infecções estavam recém visíveis ao olho humano, além da presença de outros patógenos de plantas e animais (WEE et al., 2015). Através do uso combinado de dispersão Raman amplificada por superfície (SERS- do inglês *Surface-Enhanced Raman Scattering*) e RPA, Lau et al. (2016) conseguiu detectar *B. cinerea*, *Pseudomonas syringae* e *Fusarium oxysporum* nas fases sintomáticas iniciais; porém, testes de sensibilidade demonstraram que o sistema é capaz de detectar tão pouco quanto 2 genomas purificados do patógeno alvo.

O consorcio SAFEGRAPE, em um projeto de mesmo nome coordenado pela empresa alemã Eaton Technologies GmbH entre 2009 e 2011, desenvolveu um pequeno biossensor amperométrico para mensuração de atividade lacase, uma enzima produzida por *B. cinerea* capaz de catalisar a oxidação de compostos fenólicos, em suco de uva (CORDIS). O dispositivo desenvolvido possui limite de detecção de 0,2 ULA (unidades de atividade lacase) e limite de

quantificação de 0,7 ULA, apresentando o resultado em 4min (CORDIS). Porém não foram encontrados artigos científicos relativos ao projeto, pedidos de patentes ou registros comerciais do dispositivo final. De forma similares, um projeto denominado WINBIOTOOL, coordenado pela empresa espanhola Enkoa System, S.L. tem como objetivo o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a detecção de *B. cinerea* e atividade lacase em uvas e vinhos, bem como a sua integração em um sistema integrado para monitoramento e tomada de decisão em viticultura e vinicultura (EPI SISTEM). Gáspár; Brinduse; Vasilescu, (2020), grupo associado ao WINBIOTOOL, demonstrou que SPAuE (*screen-printed gold electrode*) podem ser utilizados para a determinação rápida da atividade lacase em mosto de uva. Foi identificado que microelétrodos de fibras de carbono (CFME- do inglês *Carbon Fiber MicroElectrodes*) apresentam maior sensibilidade, porém é observada uma subestimação da atividade lacase com CFME, possivelmente devido à adsorção de componentes do mosto e presença de compostos fenólicos na amostra (GÁSPÁR; BRINDUSE; VASILESCU, 2020).

4.1.3 Métodos de controle de *Botrytis cinerea*

Devido aos grandes danos econômicos causados pelo *B. cinerea*, diversas estratégias foram desenvolvidas para o controle de doenças causadas por este patógeno, incluindo práticas agronômicas e horticulturais, métodos físicos, métodos químicos, e controle biológico (DE SIMONE et al., 2020; HUA et al., 2018; PETRASCH et al., 2019). O uso de estratégias que combinem diferentes métodos de controle apresentam melhores resultados que o uso individual das mesmas, porém mesmo as estratégias de uso combinado são apenas capazes de diminuir a incidência e severidade da doença, mas não prevenir ou eliminar completamente o mofo cinzento (PETRASCH et al., 2019).

4.1.3.1 Práticas agronômicas e horticulturais

As práticas agronômicas e horticulturais se referem às atividades que podem ser realizadas com o intuito de suprimir o crescimento do patógeno em

condições de campo, como limitar a presença de água, cultivar plantas com maior resistência, evitar o contato das frutas com o solo ou fontes de inóculo e prevenir danos aos tecidos vegetais (ELAD, 2016; PETRASCH et al., 2019). Regiões caracterizadas por primaveras quentes e secas ou onde a ocorrência de vento é prevalente em algum momento do dia são preferenciais no momento de selecionar o local de cultivo (ROMANAZZI; FELIZIANI, 2014). O deslocamento de ar e temperatura são importantes fatores para a redução do acúmulo de água na superfície das plantas. De forma similar, a seleção do sistema de irrigação, como gotejamento e microaspersão, pode reduzir a incidência de mofo cinzento através da redução da dispersão de inóculo e redução da formação de películas de água (PETRASCH et al., 2019; ROMANAZZI; FELIZIANI, 2014). A remoção de folhas próximas às frutas, remoção de tecidos necróticos e/ou senescentes e redução da densidade de plantas, promovem a diminuição do contato entre plantas e tecidos, limitando o crescimento e dispersão de inóculos (ELAD, 2016).

A suplementação nutricional de cálcio aparenta ser capaz de reduzir os níveis de mofo cinzento em culturas vegetais (ELAD, 2016). Os possíveis mecanismos pelos quais altos níveis de cálcio em tecidos vegetais podem reduzir fitopatologias incluem a redução de emissão de etileno pelos tecidos da planta; diminuição da susceptibilidade das membranas, em particular constituintes de pectina, a enzimas hidrolíticas do patógeno; e redução do vazamento de nutrientes para a superfície da planta (ELAD, 2016; ELAD; EVENSEN, 1995). Outro nutriente que apresenta resultados interessantes na defesa contra *B. cinerea* é o boro, pois tem a capacidade de destruir a membrana celular, resultando na liberação do conteúdo citoplasmático do patógeno (QIN et al., 2010).

4.1.3.2 Métodos físicos

Os métodos físicos buscam controlar diversos parâmetros como temperatura, pressão de gás relativa e absoluta, radiação ultravioleta (UV), dentre outros (DE SIMONE et al., 2020). A temperatura, umidade relativa e presença de água livre na superfície da planta são importantes fatores para o

desenvolvimento de conídio e progressão de mofo cinzento que podem ser controlados por métodos físicos. Em estufas, o aquecimento e aeração são capazes de reduzir a umidade relativa e orvalho em tecidos suscetíveis, porém o aumento da temperatura, sem aeração ou ventilação, pode resultar no aumento da incidência de mofo cinzento (ELAD, 2016). A temperatura normalmente não é um fator limitante para o desenvolvimento do *Botrytis*, porém o armazenamento de flores em baixas temperaturas (próximas de 0°C) promove a desaceleração do processo de senescência dos tecidos, diminuindo consequentemente a suscetibilidade dos mesmos ao fungo (BIKA; BAYSAL-GUREL; JENNINGS, 2020). Em contrapartida, no armazenamento pós-colheita de frutas como uvas e morangos, baixas temperaturas tornam os tecidos menos responsivos à infecção devido ao enfraquecimento dos mecanismos de defesa (ROMANAZZI; DROBY, 2016).

Resultados interessantes foram observados no cultivo de plantas suscetíveis ao mofo cinzento em tuneis de plástico capazes de absorver determinadas frequências do espectro luminoso. Foi demonstrado que filmes de polietileno e filmes de cloreto de polivinil capazes de filtrar radiação UV, em especial radiação UV-A (320 a 400nm), foram capazes de reduzir a esporulação do *B. cinerea* (DIK; WUBBEN, 2007; ELAD, 2016). Em contrapartida, estudos demonstram que o uso de radiação UV-C (10 a 280nm), não somente é capaz de inibir a germinação de conídios e crescimento do micélio de *B. cinerea*, através de mudanças estruturais e fisiológicas, como também é capaz de promover a maior ativação de mecanismos de defesa das plantas tratadas, como uvas, rosas, tomates, morango, cenouras, entre outras (JANISIEWICZ et al., 2016; JIN et al., 2017; MERCIER; ARUL; JULIEN, 1993; NIGRO; IPPOLITO; LIMA, 1998; VÁSQUEZ et al., 2020; VEGA et al., 2020).

A sanitização de frutas, legumes e flores é uma forma de reduzir a quantidade de fungos presentes na superfície dos produtos. Por exemplo, a submersão em água quente, a aproximadamente 50°C, é capaz de reduzir o crescimento fúngico, aumentando o tempo de prateleira de produtos como uvas, rosas e morangos (BIKA; BAYSAL-GUREL; JENNINGS, 2020; GARCÍA; AGUILERA; JIMÉNEZ, 1996; KAHRAMANOĞLU et al., 2020; VILAPLANA et al., 2020).

4.1.3.3 Controle biológico

Nos últimos anos, um grande interesse no desenvolvimento de métodos alternativos ao controle por fungicidas de *B. cinerea* tem surgido, não somente devido aos danos ambientais e possíveis malefícios a saúde, bem como devido ao surgimento de linhagens resistentes. As estratégias de controle biológico, através de preparações contendo organismos vivos e/ou substâncias de origem natural como extratos de plantas e compostos orgânicos ou minerais, tem demonstrado resultados muito interessantes já em escala comercial, sendo ferramentas de baixo impacto ambiental, e promissoras no combate ao mofo cinzento (DE SIMONE et al., 2020; NICOT et al., 2016).

Diversos microrganismos demonstraram efeitos positivos no controle de mofo cinzento, tais como *Bacillus subtilis*, *Streptomyces griseoviridis*, *Pseudomonas syringa*, *Micromonospora* spp., *Trichoderma harzianum*, *Ulocladium oudemansii*, *Chlonostachys rosea*, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, dentre outros, distribuídos entre bactérias, leveduras e fungos filamentosos (DE MEYER et al., 1998; MAB et al., 2003; MARTÍNEZ-HIDALGO; GARCÍA; POZO, 2015; NALLY et al., 2012; QIN et al., 2015; THOMIDIS et al., 2015; TOURÉ et al., 2004; VERHAGEN et al., 2010; WHITE et al., 1990). Os mecanismos de ação associados com a supressão do *B. cinerea* por esses agentes biológicos são múltiplos, podendo mais de um ser efetivado por cada um dos organismos, em combinações e níveis diferentes (ELAD; STEWART, 2007; NICOT et al., 2016). Alterações na superfície do hospedeiro, competição por nutrientes, supressão da germinação de conídios, secreção de metabólitos secundários antibióticos, inibição de fatores de virulência, ligação a superfície do patógenos, hiperparasitismo e indução de resistência por parte do hospedeiro são os principais mecanismos utilizados por microrganismos antagonistas ao mofo cinzento (DE MEYER et al., 1998; ELAD; BÉLANGER; KOHL, 1999; ELAD; STEWART, 2007; NICOT et al., 2016; ZIMAND, 1996).

Extratos vegetais possuem em geral composições complexas, contendo uma grande diversidade de compostos, que podem atuar sinergicamente ou

individualmente na interferência de diversos processos nos patógenos, bem como induzir o aumento das respostas de defesas da planta hospedeira, sendo assim capazes de modular a incidência e severidade de fitopatologias (DE SIMONE et al., 2020; NICOT et al., 2016). Extratos de *Allium sativum*, *Satureja hortensis*, *Moringa oleífera*, *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), *Reynoutria sachalinensis*, por exemplo, já tiveram suas atividades contra doenças botríticas demonstradas, sendo os dois últimos comercializados sob nome de Regalia® (Marrone Bio Innovations, Davis, California, EUA) e TIMOREX GOLD® (STK Stockton Group, Petach Tikva, Israel), respectivamente (AHMADU et al., 2021; NICOT et al., 2016; ŞESAN et al., 2015).

O uso de óleos essenciais, por sua vez, também tem ganhado notoriedade devido à grande aceitação pelo público, presença de compostos antioxidantes, antimicrobianos e volatilidade, o que facilita a sua aplicação em pequenas quantidades (SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014). Óleo essencial de alho, canela e geraniol, por exemplo, foram capazes de reduzir a germinação conidial de *B. cinerea* em 90% e comprimento de tubo germinativo em 80% *in vitro* (DAVIDSON et al., 2007).

Apesar do potencial apresentado pelas estratégias de controle biológico e vantagens à saúde humana e ambiental, o uso dos mesmos deve ser cuidadosamente controlado, pois existe o risco do surgimento de linhagens resistentes a *B. cinerea*, caso se tornem amplamente aplicados a campo (NICOT et al., 2016).

4.1.3.4 Métodos químicos

O manejo integrado de pestes, incluindo o uso de cultivares resistentes, medidas profiláticas ou a aplicação de controle biológico, é necessário, porém nem sempre é o suficiente para o controle de doenças causadas por *B. cinerea* e outros *Botrytis* (FILLINGER; WALKER, 2016). Apesar dos avanços em estratégias alternativas de manejo, o controle químico através de fungicidas, principalmente na forma de fungicidas sintéticos, atuantes em *Botrytis spp.* continua o principal método de controle utilizado contra *B. cinerea* (BIKA;

BAYSAL-GUREL; JENNINGS, 2020; FILLINGER; WALKER, 2016; HUA et al., 2018; PETRASCH et al., 2019).

Segundo o Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas (FRAC- do inglês, *Fungicide Resistance Action Committee*), o *B. cinerea* é considerado um patógeno de alto risco devido o rápido desenvolvimento de linhagens de resistência a fungicidas e resistência a múltiplos fungicidas em uma mesma população. Os fungicidas de forma geral, bem como os outros métodos de manejo, são preventivos, uma vez que atuam na superfície da planta impedindo a penetração do fungo nos tecidos, porém alguns podem atuar de forma curativa, ao se difundirem pelos tecidos vegetais, afetando o fungo após a infecção (FILLINGER; WALKER, 2016). Esses agroquímicos podem atuar em funções celulares específicas, sendo denominados sítio-específicos, ou atuar sobre mais de uma função celular, sendo classificados como multissítios (FILLINGER; WALKER, 2016; LEROUX, 2007).

Os fungicidas multissítios mais utilizados contra doenças botríticas são moléculas pertencentes às famílias cloronitrila (FRAC M 05), ftalimidas (FRAC M 04), sulfamidas (FRAC M 06), ditiocarbamatos (FRAC M 03) e sais de enxofre (FRAC M 02) (DE SIMONE et al., 2020; FILLINGER; WALKER, 2016; FRAC, 2021; LEROUX, 2007). A maioria desses compostos previnem a germinação de conídios através da inibição de enzimas que possuem grupos tiol, diminuindo sua atividade e/ou a formação de pontes dissulfeto (BERNARD; GORDON, 2000; CORBETT; WRIGHT; BAILLIE, 1984). Historicamente, os principais fungicidas sítio-específico utilizados no combate a *Botrytis* spp. são subdivididos em pelo menos 5 categorias correspondentes às funções celular que afetam: (i) citoesqueleto (microtúbulos); (ii) respiração mitocondrial e síntese de adenosina trifosfato (ATP); (iii) síntese de aminoácidos ou proteínas; (iv) transdução de sinal; (v) biossíntese de esterol em membranas (FILLINGER; WALKER, 2016; FRAC, 2021; HAUSBECK; HARLAN, 2020; LEROUX, 2007). Porém, fungicidas de outras classes como, atuantes na biossíntese da parede celular, são também utilizados no controle de *B. cinerea* (HAUSBECK; HARLAN, 2020). Os principais fungicidas multissítios e sítio-específico utilizados no combate a mofo cinzento podem ser encontrados no Quadro 2.

Quadro 2 - Modo de ação, grupo químico, exemplo e código FRAC dos principais fungicidas utilizados no controle de *B. cinerea*.

Modo de ação	Grupo químico	Exemplo	Código FRAC
Citoesqueleto (microtúbulos)	Benzimidazóis	Carbendazim	FRAC 1
	Tiofanatos	Tiofanato metílico	FRAC 1
	N-fenil carbamatos	Dietofencarbe	FRAC 10
	Toluamidas	Zoxamida	FRAC 22
Respiração mitocondrial e síntese de adenosina trifosfato (ATP)	Fenil-oxo-etil tiofeno amida	Isofetamida	FRAC 7
	Piridinil-etil-benzamidas	Fluopiram	FRAC 7
	Pirazol carboxamidas	Benzovindiflupir	FRAC 7
	Metoxi-carbamatos	Piraclostrobina	FRAC 11
	Benzil-carbamatos	Piribencarbe	FRAC 11
	Oximino-acetatos	Trifloxistrobina	FRAC 11
Síntese de aminoácidos ou proteínas	Anilinopirimidina	Ciprodinil	FRAC 9
		Mepanipirim	FRAC 9
		Pirimetanil	FRAC 9
Transdução de sinal	Dicarboximidas	Iprodiona	FRAC 2
		Vinclozolina	FRAC 2
	Fenilpirrolas	Fludioxonil	FRAC 12
Biossíntese de esterol em membranas	Triazóis	Tebuconazol	FRAC 3
	Imidazóis	Procloraz	FRAC 3
	Hidroxianilidas	Fenehexamida	FRAC 17
	Pirizol	Fenpirazamina	FRAC 17
Biossíntese de parede celular	Nucleosídeo de peptidil pirimidina	Polioxina	FRAC 19
Químicos com ação multissítio	Ditiocarbamatos	Tiram	FRAC M 03
		Mancozebe	FRAC M 03
	Ftalimidas	Captana	FRAC M 04
		Folpete	FRAC M 04
	Cloronitrilas	Clortalonil	FRAC M 05
	Sulfamidas	Diclofluanida	FRAC M 06

A resistência a fungicidas multissítios é raramente observada, possuindo assim baixo risco do surgimento de linhagens resistentes; porém, são necessárias grandes quantidades para apresentarem efeitos preventivos, enquanto fungicidas sítio-específico necessitam de quantidades menores, porém apresentam normalmente riscos mais elevados, dependendo do fungicida, para o desenvolvimento de resistência (FILLINGER; WALKER, 2016; FRAC, 2021; LEROUX, 2007). Análises realizadas nos Estados Unidos da América (EUA) demonstraram diversos isolados de *B. cinerea* com resistência parcial a total a fungicidas FRAC 1 (Metil Benzimidazol Carbamato), com diferentes níveis de

resistência a fungicidas FRAC 2 (Dicarboximidas) e 7 isolados de diferentes regiões com resistência a todos os fungicidas FRAC sítio-específico (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2014; WEDGE et al., 2013).

Não somente devido ao risco do surgimento de linhagens resistentes, bem como devido aos possíveis danos ambientais e à saúde humana que o uso de fungicidas podem causar, há uma tendência mundial na redução do uso dos mesmos e regulamentações mais restritivas quanto à quantidade e frequência de aplicação. Nesse sentido, o manejo de resistência é estratégia essencial para a aplicação efetiva e segura de fungicidas, que se baseia na utilização de medidas profiláticas, indução de resistência em hospedeiros, utilização de hospedeiros resistentes e compostos antifúngicos para desacelerar o surgimento de linhagens de resistência na cultura. As práticas agronômicas e horticulturais e alguns métodos físicos apresentados nos tópicos anteriores se caracterizam como métodos profiláticos, diminuindo a necessidade de aplicação de botriticidas. A frequência e a quantidade de aplicações controladas, aplicações nos momentos mais adequados e uso efetivo combinado de fungicidas são práticas que devem ser bem empregadas para a efetividade do manejo de resistência (FILLINGER; WALKER, 2016). Além disso, o desenvolvimento e aplicação de novas metodologias de controle devem ser realizadas para reduzir ao máximo o desenvolvimento de linhagens resistentes.

4.1.3.5 Controle de *Botrytis* baseado em silenciamento gênico

Dentre as possibilidades de metodologias inovadoras no controle de *B. cinerea* está a aplicação de métodos transformativos e não transformativos baseados no silenciamento gênico. O silenciamento gênico pós-transcricional no controle de pragas como vírus, viróides, bactérias, fungos, oomicetos, insetos e nematoides, é tecnologia em ascensão baseada no mecanismo eucarioto natural de regulação gênica por ação de RNAs não codificantes (ncRNAs) (CAI et al., 2018; ZOTTI et al., 2018).

Estudos recentes demonstram que não somente o *B. cinerea* é capaz de secretar *small RNAs* (sRNAs) para afetar processos celulares do hospedeiro, como também ser alvo de sRNAs presentes no ambiente e enviados pelo

hospedeiro (CAI et al., 2018; WANG et al., 2016). Nesse sentido, métodos transformativos como o desenvolvimento de plantas transgênicas, ou métodos não transformativos, como produtos contendo ncRNAs na sua formulação, baseados em silenciamento gênico são novas alternativas potenciais no controle de mofo cinzento.

4.2 Silenciamento gênico pós-transcricional

Uma vez que, de forma geral, o material genético é mantido constante dentre os diversos tipos celulares de um indivíduo, a regulação gênica se apresenta como uma forma de permitir a diferenciação celular e adaptações a diferentes condições internas e externas, sendo assim crucial no desenvolvimento e sobrevivência de organismos de todos os reinos, principalmente de organismos eucariotos multicelulares (ALBERTS et al., 2017; ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014). O controle da expressão gênica é um processo extremamente complexo envolvendo os mais diversos mecanismos, regulados e realizados através de complexos proteicos, ácidos nucléicos e outros fatores orgânicos e inorgânicos atuando em diferentes níveis do dogma central da biologia molecular (ALBERTS et al., 2017).

Em plantas, o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS, do inglês *Post-transcriptional gene silencing*), é um mecanismo de regulação gênica que atua diretamente em RNAs mensageiros alvos, diminuindo a taxa final de síntese de seus produtos proteicos (ALBERTS et al., 2017; ZHANG et al., 2016). Esse mecanismo é induzido pela presença de RNAs de fita dupla (dsRNA), podendo esses serem originários de vias endógenas ou exógenas. Portanto, este mecanismo atua regulando genes do próprio organismo (via endógena), bem como apresenta um papel na proteção contra material genético invasor (via exógena) (ALBERTS et al., 2017; ZHANG et al., 2016). Esse processo é baseado na utilização de complexos proteicos que utilizam sRNA não codificantes, através do pareamento de bases, para o reconhecimento e silenciamento de mRNAs alvos (ALBERTS et al., 2017; ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Existem diferentes classes de ncRNAs, classificados conforme a sua origem: *micro RNA* (miRNA), *small interfering RNA* (siRNA), *PIWI-interacting*

RNA (exclusivo de animais), *transfer RNA-derived small RNA* (tsRNA), *long ncRNA* (lcnRNA) (WANG; MEI; REN, 2019). Apesar de compor apenas uma fração dos ncRNAs existentes, os miRNAs apresentam grande importância biológica sendo essenciais para o desenvolvimento normal de plantas e animais (O'BRIEN et al., 2018; WANG; MEI; REN, 2019).

4.2.1 miRNAs

Os miRNAs são uma classe de ncRNA curtos endógenos, possuindo de 20 a 24 nucleotídeos, que estão envolvidos majoritariamente na regulação pós-transcricional em muitos organismos eucariotos, sendo peças-chave em diversos processos biológicos como, nutrição, crescimento, desenvolvimento e resposta a estresses bióticos e abióticos (BUDAK; AKPINAR, 2015; MA et al., 2020; WANG; MEI; REN, 2019). Essas moléculas podem ser exportadas de célula para célula através de exossomas, permitindo assim a sua atuação a nível sistêmico e até mesmo entre organismos em interações simbióticas ou parasíticas (GUALTIERI; LEONETTI; MACOVEI, 2020; WANG et al., 2016). Milhares de miRNAs já foram identificados e depositados no banco de dados *miRBase* (<http://www.mirbase.org/>), que conta no presente momento com 38589 entradas, demonstrando assim a sua abundância na natureza (KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2019).

Essas moléculas são codificadas pelos genes *miRNA* (MIR), presentes no genoma de organismos eucariotos, que são então transcritos e processados até atingirem sua configuração final, se ligarem aos componentes do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC- do inglês, *RNA-induced silencing complex*) para atuar na regulação gênica (BUDAK; AKPINAR, 2015; YU; JIA; CHEN, 2017). Todas as etapas desse processo são extensamente reguladas por diversos mecanismos, permitindo sua atuação de forma dinâmica e precisa (ACHKAR; CAMBIAGNO; MANAVELLA, 2016; YU; JIA; CHEN, 2017).

4.2.1.1 Ciclo biológico de miRNAs

4.2.1.1.1 Biogênese de miRNAs e formação do RISC

Usualmente, MIRs se localizam em regiões intergênicas em unidades de transcrição independentes; porém, alguns MIRs estão localizados em sequências intrônicas de genes codificantes de proteínas, podendo ser co-transcritos com seus genes hospedeiros (STEPIEN et al., 2017; YU; JIA; CHEN, 2017). De forma similar a genes codificantes de proteínas, a transcrição de genes *MIR* é realizada pela RNA Polimerase II (RNAPII), produzindo miRNA primários (pri-miRNAs) que possuem um nucleosídeo 7-metilguanossina (m⁷G), ou *cap*, na terminação 5' e uma cauda poli(A) na terminação 3' (características de todas os produtos da RNAPII) (BUDAK; AKPINAR, 2015; SONG et al., 2019; STEPIEN et al., 2017). Esse processo é realizado com o auxílio de diversos fatores de transcrição como *Mediator*, *Negative On TATA Less 2* (NOT2), *Cell Division Cycle 5* (CDC5), *Elongator* e *TOUGH* (ACHKAR; CAMBIAGNO; MANAVELLA, 2016; BUDAK; AKPINAR, 2015; YU; JIA; CHEN, 2017). Bhat et al. (2020) demonstrou que a mRNA adenosina metilase (MTA) introduz nucleosídeo 6-metiladenosina em miRNAs, permitindo a formação de estrutura secundária adequada dessas moléculas e o posterior processamento das mesmas.

Na via canônica, o pri-miRNA se dobra formando uma estrutura *hairpin*, que é reconhecida pela enzima RNase III *Dicer-like 1* (DCL1), componente do complexo *dicing* (também conhecido como *dicing bodies* ou *d-bodies*) em conjunto com as *Hyponastic Leaves 1* (HYL1) (também conhecida como *Double-stranded RNA-binding Protein 1*[DRB1]), *Serrate* (SE) e outras proteínas auxiliares (BOLOGNA et al., 2018; YU; JIA; CHEN, 2017). Destas, o principal responsável pelo processamento de miRNAs é a DCL1, que realiza a clivagem do pri-miRNA para miRNA precursor (pre-miRNA) e a clivagem posterior para formação do duplex miRNA/miRNA*, livre de introns e contendo extremidades 3'OH sobrepostas (STEPIEN et al., 2017; WANG; MEI; REN, 2019). Essas clivagens consecutivas podem ocorrer tanto no sentido base-para-loop, quanto loop-para-base. O tamanho da família DCL varia conforme a espécie vegetal,

tendo sido identificadas, por exemplo, 4 na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, 3 em *Saccharum spontaneum*, 5 em *Citrus sinensis* e 8 em *Oryza sativa* (CUI et al., 2020; SABBIONE et al., 2019). As variantes dessa enzima definem o tamanho final do miRNA, agindo assim como uma régua (BUDAK; AKPINAR, 2015). A maioria dos miRNAs possuem 21 nucleotídeos, sendo assim processados pela DCL1 ou DCL4. As DCL2 e DCL3 geram respectivamente produtos de 22 e 24 nucleotídeos em vias não canônicas (BUDAK; AKPINAR, 2015; STEPIEN et al., 2017; YU; JIA; CHEN, 2017). Recentemente, foi demonstrado por Cambiagno et al. (2021), que a HASTY (HST) interage com a complexo *Mediator* subunidade 37 (MED37) e a DCL1, estabilizando o complexo e promovendo o processamento do pri-miRNA.

Contrariando crenças anteriores, estudos recentes sugerem que a transcrição e processamento de miRNAs são fortemente interligados. O complexo *Elongator*, necessário para ligação da RNAPII no loci MIR, interage com a DCL1 e SE, sendo essa ligação dependente para ligação do DCL1 na cromatina. Foi demonstrado também que a MTA e TOUGH são necessárias para a co-localização eficiente da DCL1 e HYL1 (BHAT et al., 2020). Além disso, os fatores de transcrição CDC5, NOT2 e *Elongator* interagem com o complexo *d-bodies* para promover o processamento de miRNA (YU; JIA; CHEN, 2017). Zhang et al. (2020) demonstrou que o complexo *Transcript Export 2* (TREX2) interage com a RNAPII para promoção de transcrição dos genes MIR e interage com a SE para promoção da formação dos corpos *dicing*. Dessa forma, sugere-se que no mínimo o complexo *d-bodies* é recrutado durante o processo de transcrição, porém há a possibilidade que o processamento se inicie ainda nessa etapa.

Ainda no nucleoplasma, o duplex miRNA/miRNA* é então estabilizado através da O-metilação das terminações 3' pela enzima metiltransferase *Hua Enhancer 1* (HEN1), que interage com a DCL1 e HYL1, deslocando a SE para fora do complexo. Esse processo protege o miRNA de diferentes vias de degradação que serão posteriormente mencionadas. Por muito tempo, acreditou-se que o duplex era exportado para o citoplasma pela proteína HST e então integrado ao RISC, porém mutações na mesma não afetam o acúmulo de miRNA no núcleo (BUDAK; AKPINAR, 2015). Bologna et al. (2018) demonstrou

que a Argonauta 1 (AGO1) é capaz de se deslocar do citoplasma para o nucleoplasma, via interação com a EXPORTIN1, onde interage com o duplex miRNA/miRNA* para formação do RISC e posterior exportação do complexo para o citoplasma. Após esse processo, o deslocamento do complexo AGO1-miRNA é promovido pelo complexo TREX2 em interação com a Nucleoporina 1 (NUP1) (Ver Figura 3) (ZHANG et al., 2020a).

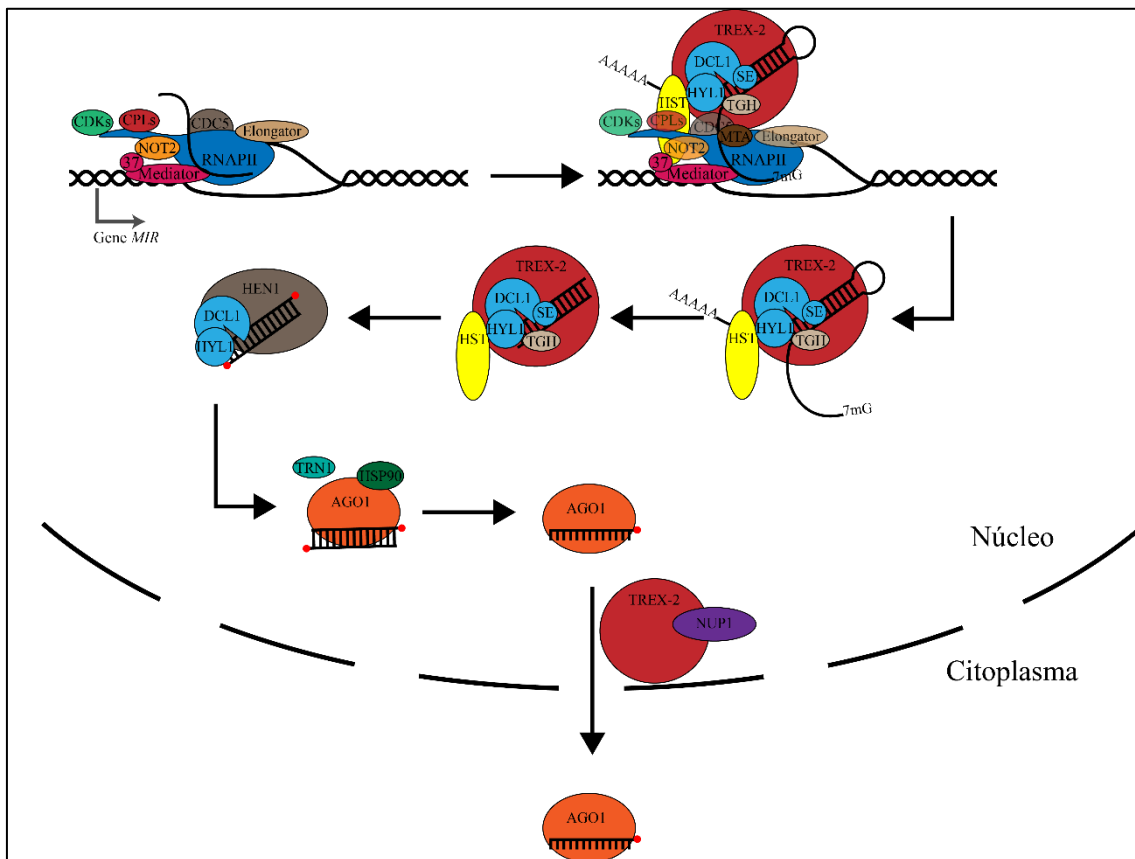


Figura 3 - Visão geral da biogênese do miRNA. O processo de biogênese de miRNAs, é iniciado pela transcrição dos genes *MIR* pela RNA polimerase II (RNAPII), dando origem a um miRNA primário com auxílio de diversas proteínas como a *Mediator*, *Elongator*, dentre outras. O miRNA primário com auxílio de proteínas, como a RNA mensageiro adenosina metilase (MTA) e TOUGH, assume sua estrutura secundária de RNA de fita dupla, ativando a *Dicer-like protein 1* (DCL1) e outras proteínas do complexo *dicing*. Então a DCL1, com o auxílio do complexo *dicing*, cliva pri-miRNA em duplex de miRNA com extremidades 3' sobrepostas em dois passos, de loop para base ou base para loop. Então a *Hua Enhancer 1* (HEN1) estabiliza o duplex de miRNA metilando as suas extremidades 3', o protegendo de enzimas de degradação. Após isso, ainda no núcleo, o miRNA é carregado na Argonauta 1 com auxílio da Transportina 1 (TRN1) e *Heat Shock Protein 90* (HSP90), formando o Complexo de Silenciamento induzido por RNA (RISC). Então a *Transcript Export 2* (TREX-2) e a Nucleoporina 1 (NUP1) promovem a translocação do RISC para o citoplasma, onde o mesmo atuara no processo de silenciamento gênico. Maiores detalhes podem ser obtidos no texto.

Segundo o modelo atual de *Arabidopsis*, a formação do RISC segue os seguintes passos: (i) a AGO1 se liga ao dímero de *Heat Shock Protein 90*

(HSP90), uma chaperona molecular, formando um complexo; (ii) a ligação de adenosina trifosfato (ATP) na HSP90 causa uma mudança conformacional que permite a AGO1 a incorporar o duplex miRNA/miRNA* no complexo; (iii) a hidrólise do ATP induz a dissociação do complexo AGO1-HSP90; (iiii) a dissociação leva à mudança conformacional da AGO1, levando à remoção de uma das fitas de miRNA (fita passageira), resultando no RISC maduro contendo a fita guia (BOLOGNA et al., 2018; YU; JIA; CHEN, 2017). A *Transportin 1* (TRN1) está associada positivamente com a associação da AGO1 ao duplex de miRNA por mecanismo ainda não elucidado, porém se sugere uma interação entre as duas proteínas, ou o transporte de outros fatores acessórios entre citoplasma e núcleo, por parte da TRN1 (CUI; FANG; QI, 2016).

A seleção da fita é um processo ainda não completamente elucidado, porém sabe-se que ele não é aleatório. Além da HSP90, outros fatores como a HYL1, a proteína *C-terminal Domain Phosphatase-like 1* (CPL1), *High Osmotic Stress Gene Expression 5* (HOS5), *Arginine/Serine-Rich Splicing Factor* (RS)40 e RS41 estão também associados no processo de seleção. Além disso, há grande tendência à seleção de fitas de miRNA que possuam uridina na terminação 5' pela AGO1; porém outras Argonautas apresentam outras preferências (ACHKAR; CAMBIAGNO; MANAVELLA, 2016; SONG et al., 2019; YU; JIA; CHEN, 2017). Apesar da AGO1 ser a principal atuante no PTGS, outros membros da família desempenham atividades com miRNAs, como as AGO2, AGO4, AGO7 e AGO10 (SONG et al., 2019; YU; JIA; CHEN, 2017).

4.2.1.1.2 Degradação de miRNAs

A degradação de miRNAs é um processo de extrema importância, uma vez que os níveis dos mesmos devem ser precisamente controlados (SONG et al., 2019). Como mencionado anteriormente, o processo de metilação pela ação da HEN1 é fundamental para estabilização do miRNA. Duplex miRNA/miRNA* que não são metilados são degradados por uma 3'→5' exoribonuclease *Atrimmer 2* em *Arabidopsis* (ACHKAR; CAMBIAGNO; MANAVELLA, 2016; SONG et al., 2019). No caso de miRNA metilados livres e associados a AGO, o processo de degradação ocorre em três etapas: (i) Truncagem na terminação 3';

(ii) Uridilação do miRNA truncado; (iii) Degradação do miRNA truncado e uridilado (CHEN, 2009; YU; JIA; CHEN, 2017).

Estudos sugerem que a família de 3'→5' exonucleases *Small RNA Degrading Nuclease* (SDN), em especial as SDN1 e, possivelmente, SDN2, sejam as responsáveis pela truncagem 3' de miRNAs *in vivo* (SONG et al., 2019; YU; JIA; CHEN, 2017). A SDN1 é capaz de truncar RNAs 2'-O-metilados e miRNAs 2'-O-metilados associados a AGO1, apesar da sua atividade exonuclease ser parcialmente inibida pela presença de grupo metil na terminação 3' de miRNAs (SONG et al., 2019; YU; JIA; CHEN, 2017). Porém, a SDN1 não é capaz de degradar miRNAs uridilados, o que indica que a mesma não atua na segunda etapa do processo (YU; JIA; CHEN, 2017).

Após esta etapa de truncagem, a uridiltransferase *HEN Supressor 1* (HESO1) e *UTP:RNA Uridyltransferase* (URT1) catalizam a uridilação 3' de pequenos RNA não metilados e miRNAs não metilados ligados AGO1 *in vitro* (SONG et al., 2019). HESO1 e URT1 preferencialmente uridilam miRNAs com terminação 3' em U e A, respectivamente. Existe a possibilidade de que *in vivo*, a URT1 adicione um resíduo uridil, permitindo que a HESO1 então gere a cauda poli-U. Porém, comparações entre mutantes *urt1* e *heso1*, demonstram que a HESO1 afeta um número maior de miRNAs, sugerindo que a mesma possa realizar poliuridilação sozinha ou em cooperação com outras uridiltransferases (TU et al., 2015).

A última etapa do processo, que envolve a degradação dos miRNAs truncados e uridilados ainda não foi elucidada em plantas, uma vez que ainda não foram identificadas exonucleases que realizem a degradação de miRNAs em *Arabidopsis* ou outras plantas. Porém, com base em estudos em mamíferos, leveduras e algas foram identificados duas candidatas: *Suppressor of Varicose* e *Ribosomal RNA-Processing Protein 6-like* (RRP6L), que são respectivamente as homologas da *DIS3-like 2* e RRP6 em *Arabidopsis* (YU; JIA; CHEN, 2017).

Os mecanismos que regulam a taxa de degradação de miRNAs em plantas ainda não são completamente conhecidos, mas parecem envolver a proteína AGO10. A AGO10 é expressa em células de meristema do broto e meristema floral e, posteriormente, no lado adaxial de cotilédones e primórdios

foliares (Moussian et al., 1998; Lynn et al., 1999; Mallory et al., 2004). Essa isoforma possui maior afinidade ao miR165/166 que a AGO1; porém, ao invés de o proteger, ela o direciona para degradação, por aumentar a sua susceptibilidade à truncagem 3' por SDN1 (YU; JIA; CHEN, 2017). Durante o desenvolvimento do meristema apical de brotos, esse processo previne a repressão do gene *Homeodomain leucine zipper III (HD-ZIP III)*, assim promovendo o desenvolvimento do tecido (ZHOU et al., 2015; ZHU et al., 2011).

4.2.1.2 Modos de atuação

Como mencionado, os miRNAs em plantas atuam majoritariamente no nível de silenciamento pós-transcricional de mRNAs citoplasmáticos através da complementaridade de pares de base mRNA-miRNA (BUDAK; AKPINAR, 2015). Esse processo ocorre através de dois principais mecanismos: (i) clivagem de transcritos e (ii) supressão de tradução. No silenciamento gênico, a maioria dos miRNAs interagem com sequencias específicas na região 3' não traduzida (UTR-do inglês *untranslated region*) de mRNAs alvos; porém, foram identificadas também interações com regiões 5' UTR e sequências codificantes (O'BRIEN et al., 2018; WANG; MEI; REN, 2019).

Em animais, a alta complementariedade entre o miRNA e mRNA alvo favorece a clivagem do transcrito alvo, enquanto que a presença de sequências não complementares (*mismatches*) estão mais associadas com a supressão de tradução. Em plantas, a maioria dos miRNAs e seus alvos possuem complementariedade quase perfeita; porém foi demonstrado que mesmo nessas condições pode ocorrer supressão de tradução (BRODERSEN et al., 2008; YU; JIA; CHEN, 2017). Neste caso, a presença de proteínas específicas é determinante na sequência de eventos. Por exemplo, a proteína HYL1/DRB1 é necessária no processo de clivagem de mRNA, enquanto a DRB2 media a supressão de tradução, bem como regula negativamente a expressão de DRB1 (ACHKAR; CAMBIAGNO; MANAVELLA, 2016; SONG et al., 2019).

4.2.1.2.1 Clivagem de mRNA mediada por miRNA.

O pareamento da maioria dos miRNAs de plantas e seus mRNAs alvos resulta na clivagem do mRNA dentro da região de pareamento, formando fragmentos 5' e 3'. As proteínas da família AGO possuem um domínio PIWI, que forma uma conformação análoga a RNase H com atividade endonuclease, sendo a AGO1 a representante da via canônica (SONG, 2004; YUAN et al., 2005).

A maior parte dos fragmentos gerados nesse mecanismo são degradados por exonucleases citoplasmáticas. Os fragmentos 3' se tornam suscetíveis à ação de 5' e 3' exoribonucleases, como por exemplo a *Exoribonuclease 4* citoplasmática (SONG et al., 2019). Os fragmentos 5', que mantêm o cap na terminação 5', são primeiramente uridilados pela HESO1 e então degradados pela *RISC-interacting Clearing 3'-5' Exoribonuclease 1* (RICE1) e RICE2, com auxílio dos cofatores SKI2, SKI3 e SKI8 (BRANSCHIED et al., 2015; REN et al., 2014; ZHANG et al., 2017b). Produtos da clivagem de transcritos alvos de miRNAs de 22 nucleotídeos, ao invés de serem degradados, são estabilizados pela Proteína Supressora do Silenciamento Gênico 3 e então convertidos pela *RNA polimerase dependente de RNA 6* em dsRNAs (PRAKASH; DEVENDRAN; CHAKRABORTY, 2017). Essas moléculas são então processadas pela DCL4 em *phased secondary small interfering RNAs* (phasiRNAs), que assim como os miRNAs, podem se ligar a AGO1 para induzir a clivagem de mRNAs (SONG et al., 2019; YU; JIA; CHEN, 2017).

4.2.1.2.2 Supressão de tradução mediada por miRNA

Apesar de ocorrer com menor frequência em plantas, miRNA podem também realizar a regulação negativa de expressão gênica através da supressão de tradução. Dessa forma, há uma redução de produto proteico de forma desproporcional à redução de níveis de mRNA alvo. Os RISC associados a AGO1, AGO7 e AGO10 são capazes de realizar supressão de tradução. No caso de AGO1-RISC, os mecanismos utilizados para supressão da tradução são dependentes do local de ligação do miRNA no mRNA: AGO1-RISC ligado a 5' UTR, o qual bloqueia o recrutamento de ribossomo e início da tradução,

enquanto a ligação em área codificante bloqueia o deslocamento do ribossomo e alongamento da proteína (SONG et al., 2019).

Sabe-se que os seguintes fatores regulam seletivamente a realização desse processo: *Katanin 1*; *Varicose*; *SUO*; *Altered Meristem Program 1* (AMP1); *HYL1* (SONG et al., 2019; YANG et al., 2021; YU; JIA; CHEN, 2017). *Katanin 1* é uma subunidade da enzima regulatória da dinâmica de microtúbulos, sugerindo que a repressão de tradução esteja associada com esse mecanismo (LUPTOVČIAK et al., 2017). A *Varicose*, juntamente com as *Decapping 1* (DCP1) e DCP2, faz parte do complexo de remoção m⁷G/cap 5' presente em corpo de processamento (corpos-p) (MOTOMURA et al., 2012). *SUO* é uma grande proteína que está presente no núcleo e se localiza com a DCP1 em corpos-p (YANG; WU; POETHIG, 2012). A associação da *Varicose* e da *SUO* com a supressão de tradução indicam que a remoção do cap 5' esteja envolvida no processo (SONG et al., 2019; YU; JIA; CHEN, 2017). A AMP1, por sua vez, é uma proteína integrada a membrana do Reticulo Endoplasmático Rugoso (RER) e impede a ligação entre polissomos e mRNAs alvos de miRNAs na parede do RER, bloqueando assim sua tradução (LI et al., 2013). Dessa forma, existe a possibilidade de que componentes dos corpos-p influenciem o silenciamento realizado em contato com o RER, ou que corpos-p sejam também um local para a supressão de tradução (LI et al., 2013; XU; CHUA, 2011). Um estudo recente, realizado por Yang et al. (2021), demonstrou que na ausência de *HYL1* citoplasmática, a supressão de tradução mediada por miRNA é comprometida. A *HYL1* citoplasmática promove a interação da AGO1 com polissomos e se associa a AMP1, podendo atuar no sequestro de mRNAs alvos, porém ainda não está claro se este é o papel desta proteína no silenciamento (YANG et al., 2021).

4.3 RNA circular

Além dos miRNAs, outra classe de ncRNAs cuja atuação no silenciamento gênico pós-transcricional vem sendo estudada é a dos RNAs circulares (circRNAs). Os circRNAs compõem um novo e grande grupo de RNAs não codificantes (ncRNAs) produzidos por vias não canônicas. Essas moléculas são caracterizadas por serem RNAs de fita simples com estrutura de loop fechado

deficientes de 5' *cap* e cauda poli(A), formadas a partir da ligação covalente das terminações 5' e 3' de mRNAs prematuros em um processo chamado *backsplicing* (KRISTENSEN et al., 2019; ZHANG; LI; CHEN, 2020). Apesar de possuírem biogêneses diferentes, a estrutura de RNAs circulares em viróides e no vírus da hepatite δ foi descoberta há mais de 30 anos (KOS et al., 1986; SANGER et al., 1976). Posteriormente, circRNAs foram observados em células eucarióticas, porém foram considerados artefatos de processamento errôneo de mRNAs, sem significância biológica determinada (COCQUERELLE et al., 1993; HSU; COCA-PRADOS, 1979; NIGRO et al., 1991). Porém, nos anos recentes, através de sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-seq) e algoritmos de bioinformática específico para circRNAs, milhares de circRNAs foram identificados e anotados em protistas, fungos, insetos, peixes, vermes, plantas e mamíferos (IVANOV et al., 2015; WANG et al., 2014; WESTHOLM et al., 2014).

Wang et al. (2014) identificou, de forma inédita, circRNAs no reino vegetal através da predição dessas moléculas a partir de bibliotecas de RNA-seq de *Arabidopsis thaliana*. Nos anos seguintes então se iniciou a expansão do corpo de evidências relativo à presença e função de circRNAs em diversas espécies vegetais, como *Oryza sativa* (arroz), *Gossypium* spp. (algodão), *Hordeum vulgare* L (cevada), *Solanum lycopersicum* (tomate), *Triticum aestivum* L. (trigo comum), dentre outros (DARBANI; NOEPARVAR; BORG, 2016; LU et al., 2015; WANG et al., 2017a; YE et al., 2015; ZHAO et al., 2017a; ZUO et al., 2016). Informações sobre essas moléculas em plantas estão disponibilizadas em diversos bancos de dados, como PlantCircNet (ZHANG et al., 2017a), PlantcircBase (CHU et al., 2017, 2020), GreenCircRNA (ZHANG et al., 2020b).

4.3.1 Ciclo biológico de circRNAs

Os circRNAs podem surgir de uma grande gama de posições e combinações genômicas, incluindo exons, introns ou regiões intergênicas, inclusive do genoma de mitocôndrias e cloroplastos; porém, a maioria dos circRNAs são expressos por genes codificantes de proteínas conhecidos. Uma das características conservadas na produção de circRNAs em eucariotos é a sua dependência na transcrição mediada por RNAPII e *backsplicing* de pre-mRNAs.

Esse processo consiste na ligação do local de *splice* doador a *downstream* ao local de *splice* acceptor a *upstream*, gerando moléculas deficientes de 5' *cap* e cauda poli(A). Os mecanismos de circularização ainda não foram bem elucidados, porém há dois modelos considerados promissores. No primeiro, o processo é mediado por elementos repetitivos invertidos localizados em introns *downstream* e *upstream*, que ligam por complementariedade de bases, ou por dimerização de *RNA-binding proteins* (RBPs) que se ligam a motivos específicos nos introns flanqueadores, gerando circRNAs exônicos (deficiente de intron) ou elciRNAs (com presença de intron). No segundo, o circRNA é formado a partir de precursores de laços formados durante o escape de éxon (*exon skipping*) no *splicing* alternativo, formando um circRNAs exônico, ou a partir de precursores de laços intrônicos que escaparam à degradação, formando um circRNAs intrônico (ciRNA) (ver Figura 4) (KRISTENSEN et al., 2019; ZHAO; CHU; JIAO, 2019).

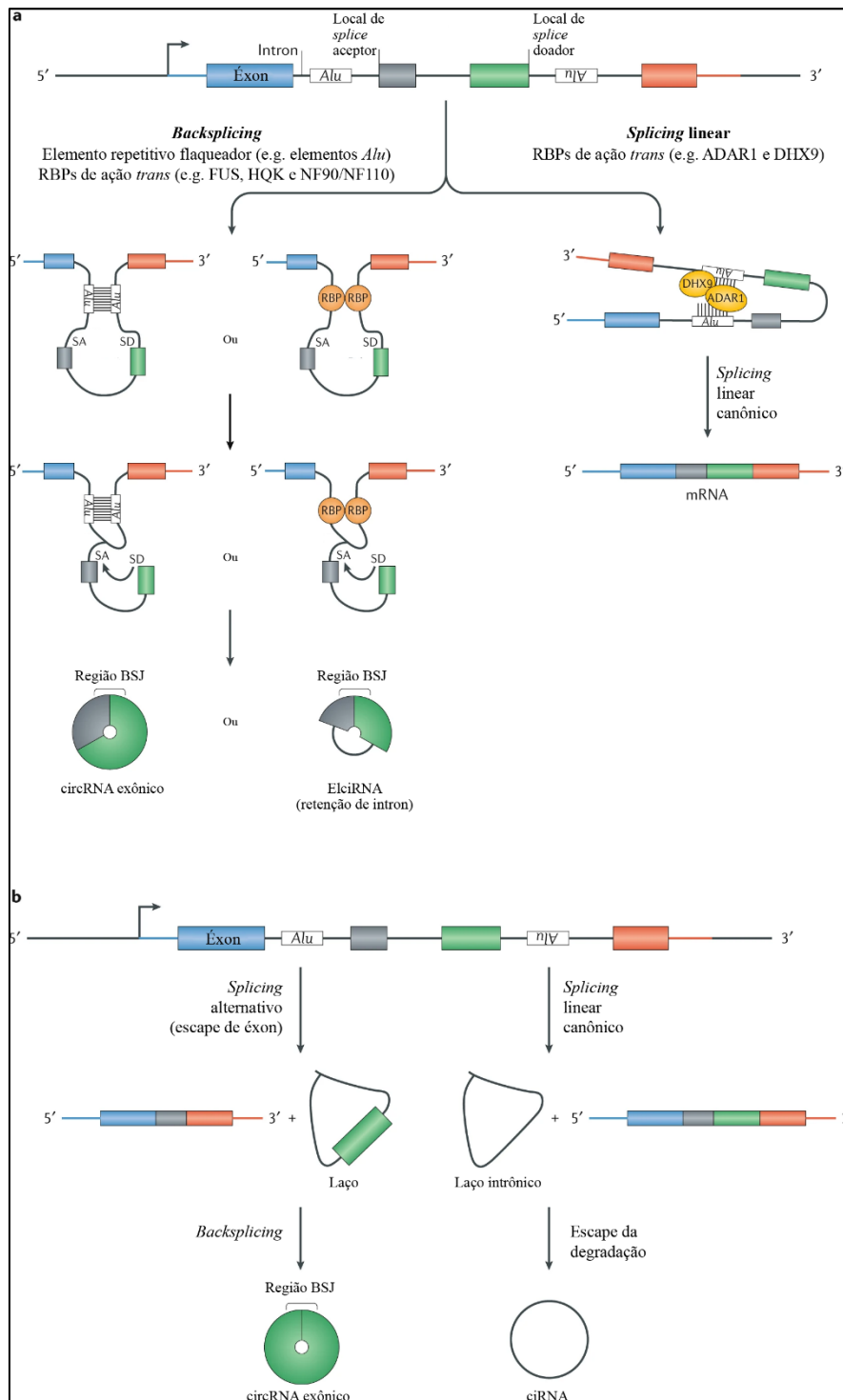


Figura 4 - Biogênese dos circRNAs. (a) A figura ilustra a competição entre o *splicing* linear e *backsplicing* de exons (barras coloridas) que ocorre durante a transcrição de genes humanos. A presença de introns flanqueadores grandes, a dimerização de *RNA-binding proteins* (RBPs) e pareamento de bases de elementos repetitivos invertidos (i.g. elementos *Alu*), favorecem o *backsplicing*, pois aproximam o local *splice acceptor* (SA) do local *splice doador* (SD), levando à formação de ElciRNAs e circRNAs exônicos (com presença de intron). As proteínas *Adenosine RNA acting on RNA 1* (ADAR1) e *DExH-Box Helicase 9* (DHX9) promovem o *splicing* linear, pois promovem a separação de elementos repetitivos invertidos. (b) CircRNAs podem ser gerados de produtos intermediários do *splicing*, conhecidos como laços, criados pelo escape de éxon, gerando circRNAs exônicos, ou a partir de laços intrônicos que escapam a degradação, gerando ciRNAs. Sigla: *backsplicing junction* (BSJ). Adaptado de: Kristensen et al. 2019

Estudos demonstram que em animais, a presença de regiões repetitivas invertidas em introns flanqueadores de exons, como elementos *ALU*, podem gerar *loops*, facilitando assim a circularização (KRISTENSEN et al., 2019). Além disso, a estrutura secundária de RNA e *RBP*s estão também associadas com a biogênese, bem como o comprimento dos introns de exons circularizados alteram significativamente a eficiência do processo (KRISTENSEN et al., 2019). Porém, circRNAs de plantas apresentam poucas sequências repetitivas e complementares em sequências intrônicas que flanqueiem exons, sugerindo assim que outros mecanismos estejam associados com a circularização em espécies vegetais (CHU et al., 2020; LAI et al., 2018; ZHANG; LI; CHEN, 2020). Chen et al. (2018) identificou em milho que as regiões adjacentes a circRNAs apresentam presença significativa de *long interspersed nuclear elements (LINE) 1-like elements (LLEs)* e seus pares complementares invertidos (*LLERCPs*), indicando que transposons possam estar associados com a formação de circRNAs em plantas. A caracterização e o ciclo biológico de circRNAs em plantas, encontram-se menos elucidados se comparados aos dados disponíveis em animais. Por exemplo, estudos demonstraram que, apesar da ubiquidade dessas moléculas, existem diversas diferenças nos mecanismos de circularização de circRNAs em plantas e em animais (ZHAO; CHU; JIAO, 2019). Assim a circularização de circRNAs em plantas pode ser regulada por mecanismos diferentes, que ainda não foram identificados (ZHANG; LI; CHEN, 2020).

Após a biogênese, a maioria dos circRNAs, com exceção daqueles que contêm introns (*elciRNA* e *ciRNA*), são exportados para o citoplasma apesar da ausência de cauda poli(A). Em humanos, a exportação ocorre pela ação das proteínas *ATP-dependent RNA helicase DDX39A*, para circRNAs curtos (de até 400 nucleotídeos) e *spliceosome RNA helicase DDX39B*, para circRNAs longos (maiores de 1200 nucleotídeos). Porém, outras espécies podem utilizar outros mecanismos e/ou requerimentos de tamanho para exportação (KRISTENSEN et al., 2019).

RNAs circulares são moléculas especialmente estáveis, possuindo meia vida de 48 horas, enquanto os mRNAs correspondentes apresentavam meia vida menores do que 20 horas. Devido à sua estrutura fechada e ausência 5' *cap* ou cauda poli(A) 3', essas moléculas são resistentes a mecanismos comuns de degradação de RNA, como exonucleases. Dados sugerem que, em humanos, circRNAs podem ser degradado pela ação de RNase L, mediante infecção viral, e que circRNAs contendo modificação com N⁶-metiladenosina (m⁶A) estão sujeitas a clivagem endonucleotídica pelo complexo ribonuclease P (RNase P)/*multidrug resistance-associated protein 1* (MRP) (KRISTENSEN et al., 2019; LIU et al., 2019; PARK et al., 2019). Em condições normais o circRNA CDR1as (ou ciRS-7) pode ser clivado pela AGO2 com a assistência do miRNA miR-671, por complementariedade quase perfeita, e posteriormente degradado por atividade exonucleolítica (HANSEN et al., 2011). Fischer et al. (2020) demonstrou em células humanas que ocorre a degradação de circRNAs, em condições normais, mediante um processo denominado *Structure-mediated RNA decay*, pois se baseia na estrutura do RNA ao invés da sua sequência linear, através das atividades de ligação a RNA e helicase da proteína *Upstream Frameshift 1* (UPF1) e atividade de ligação a RNA e fosforilação de S149 da *Ras-GTPase-activating SH3domain-binding protein 1* (G3BP1) (GUO; WEI; PENG, 2020). Todas as vias de degradação conhecidas de circRNAs estão ilustradas na Figura 5.

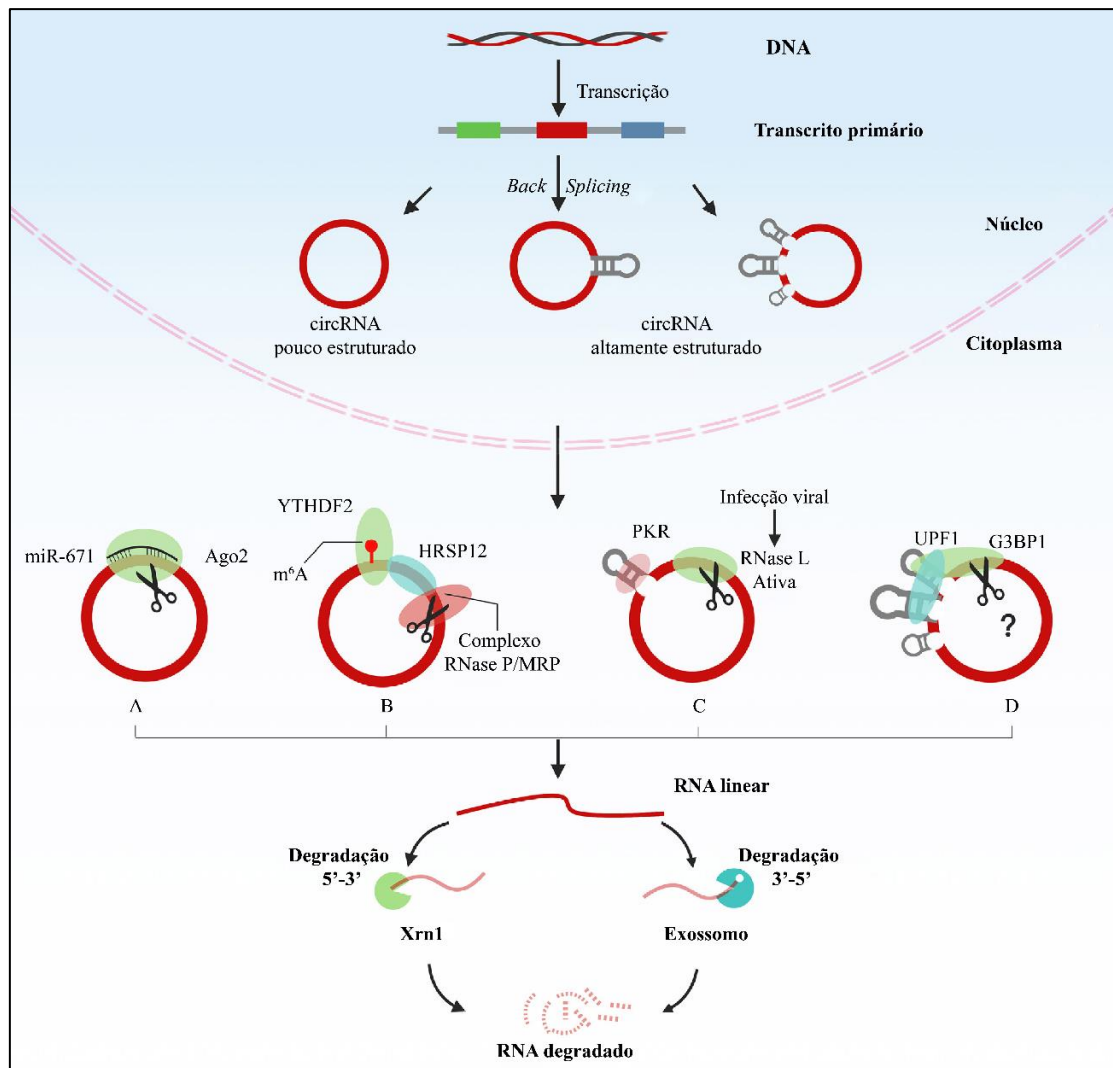


Figura 5 - Mecanismos distintos de degradação de circRNAs. A figura ilustra circRNAs de diferentes níveis de complexidade de estrutura sendo gerados por *backsplicing*, exportados para o citoplasma e passando por processos distintos de degradação, como descrito no texto. (A) mostra a degradação por atividade da AGO2, associada ao miRNA miR-671; (B) demonstra a degradação mediada por ação do complexo RNase P/MRP; (C) mostra que sob infecção viral a RNase L é ativada, catalisando a degradação de circRNAs; (D) demonstra a degradação de circRNAs altamente estruturados mediada pelas proteínas G3BP1 e UPF1. Então RNA linearizado, originados do circRNAs, são degradados pela ação da 5'-3' *exoribonuclease 1* (Xrn1) ou enzimas dos exossomos. Adaptado de: Guo; Wei; Peng, 2020.

4.3.2 Identificação e caracterização de circRNAs

Os avanços nas técnicas de sequenciamento de RNAs e desenvolvimento de novas ferramentas de bioinformática permitiram grandes avanços nos estudos de RNAs, incluindo a detecção de circRNAs. Porém, a maioria dos conjuntos de dados de RNA-seq públicos foram montados com base no isolamento de RNAs pela presença de cauda poli(A) (KRISTENSEN et al., 2019; LAI et al., 2018). Embora moléculas de circRNAs estejam presentes neste tipo

de biblioteca, devido aos baixos níveis de expressão, a detecção e quantificação dos mesmo é desafiadora nesses bancos (LAI et al., 2018). Nesse mesmo sentido, bancos para estudo de circRNAs devem usar métodos alternativos à filtragem por cauda poli(A) para remoção de RNAs ribossômicos (rRNA) (KRISTENSEN et al., 2019). A utilização de ribonuclease R (RNase R), a qual degrada RNAs lineares, antes da remoção de rRNA e preparação da biblioteca de RNA-seq, favorece a identificação de circRNAs (LAI et al., 2018). Após a identificação dos circRNAs por bioinformática, essas moléculas podem ser validadas por diferentes métodos, como por exemplo sequenciamento de Sanger, PCR com transcriptase reversa (RT-PCR) (KRISTENSEN et al., 2019; SHAO et al., 2019).

O processamento dos dados obtidos é então realizado por algoritmos, com o intuito de viabilizar a identificação de circRNAs com eficiência e acurácia, como por exemplo o MapSplice (WANG et al., 2010), find_circ (MEMCZAK et al., 2013), circRNA_finder (WESTHOLM et al., 2014), CIRCexplorer (ZHANG et al., 2014), CIRI (GAO; WANG; ZHAO, 2015), KNIFE (SZABO et al., 2015), PcircRNA_finder (CHEN et al., 2016a), CircPlant (ZHANG et al., 2020c), JEDI (JIANG et al., 2020) e PCirc (YIN et al., 2021). Análises comparativas realizadas por Hansen et al. (2016) e Zeng et al. (2017) demonstraram que de forma geral CIRI, CIRCexplorer e KNIFE apresentam melhor balanço entre sensibilidade e precisão na identificação de circRNAs em animais, bem como a utilização combinada de diferentes ferramentas pode reduzir significativamente a quantidade de falsos positivos. Porém, as análises citadas não incluem algoritmos específicos para plantas, como PCirc, CircPlant e PcircRNA_finder, bem como novos algoritmos foram desenvolvidas desde então, sendo assim necessária a realização de novas análises comparativas para contemplar essas ferramentas.

Devido à crescente quantidade de dados de circRNAs sendo gerados, bem como às necessidades específicas de cada tipo de análise, diversos bancos de dados para circRNAs foram desenvolvidos (ZHAO; CHU; JIAO, 2019). Porém, os bancos de dados específicos para circRNAs de plantas ainda são escassos, tendo como principais representantes: PlantCircNet (ZHANG et al., 2017a), PlantcircBase (CHU et al., 2017, 2020), AtCircDB (YE et al., 2019), CropCircDB

(WANG et al., 2019b), CircFunBase (MENG et al., 2019), ASmiR (WANG et al., 2019a), GreenCircRNA (ZHANG et al., 2020b), acumulando mais de 200 mil entradas de circRNAs em mais de 60 espécies vegetais.

Estas estratégias de bioinformática foram utilizadas em diferentes espécies vegetais e mostraram que a abundância de circRNAs e de suas classes se apresenta dependente da espécie vegetal. Por exemplo, foram identificados, em diferentes trabalhos, 5372 circRNAs em *Glycine max L.* (soja), 3582 em *Actinidia chinensis* (kiwi), 2932 em *Oryza sativa* (arroz), 2787 em *Cucumis sativus* (pepino), 2174 em *Zea mays L.* (milho), 2098 em *Solanum tuberosum* (batata), 1354 em *Arabidopsis thaliana*, 854 em *Solanum lycopersicum* (tomate), 342 *Camellia sinensis* (camomila), 285 a 478 em diferentes variantes de *Triticum aestivum L.* (trigo comum) (FAN et al., 2020; TONG et al., 2018; WANG et al., 2017b; XU et al., 2019; ZHANG et al., 2019; ZHAO et al., 2017b; ZHOU et al., 2017; ZHU et al., 2019; ZUO et al., 2016). Esses mesmos estudos indicam que trigo, arroz, milho, *Arabidopsis*, tomate, camomila e pepino apresentam maior quantidade de circRNAs exônicos, enquanto kiwi e batata favorecem circRNAs de regiões intergênicas e soja apresenta quantidades similares de circRNAs intrônicos e exônicos, favorecendo levemente ao primeiro. Porém esses dados estão diretamente associados com o método *in silico* aplicado para identificação, podendo assim variar conforme as ferramentas e parâmetros utilizadas.

4.3.3 Modos de atuação dos circRNAs em plantas

Apesar da crescente quantidade de evidências da funcionalidade de circRNAs, os mecanismos de ação dos mesmos, em maior parte, ainda não foram elucidados. A maioria dos circRNAs são altamente regulados, bem como apresentam padrões de expressão específicos para tipo celular, tecido ou fase do desenvolvimento, o que indica que sua produção é intencional, diferentemente do que se acreditava posteriormente (KRISTENSEN et al., 2019; LAI et al., 2018). A funcionalidade dessas moléculas tem sido demonstrada em estudos, porém ainda não foi identificada uma função única que seja desempenhada por todos os membros dessa classe. Diversos mecanismos de funcionalidade foram identificados em animais e podem estar presentes de forma

conservada em plantas, como por exemplo: esponja de miRNA; regulação da expressão gênica; esponja de proteínas; aumentar a função de proteínas; atuar como molde para mediar formação complexa entre enzimas específicas e substratos; recrutar proteínas para localizações específicas; tradução para proteínas (KRISTENSEN et al., 2019; LAI et al., 2018; LU, 2020).

Estudos em animais demonstraram que circRNAs podem funcionar como esponjas de miRNA, impedindo os mesmos de regularem seus genes alvos (KRISTENSEN et al., 2019; LU, 2020; ZHANG; LI; CHEN, 2020). As moléculas que possuem múltiplos locais de ligação para miRNA, podem ancorar os mesmos agindo como molécula mimetizando o mRNA alvo (*target mimicry*) em plantas, ou RNAs endógenos competitivos em animais (KRISTENSEN et al., 2019; ZHAO; CHU; JIAO, 2019). Diversos estudos demonstram, principalmente através de ferramentas de bioinformática, que circRNAs em plantas também apresentam o potencial de agir como esponjas de miRNAs, porém a porcentagem de moléculas com essa capacidade é menor, quando comparado com animais (ZHANG; LI; CHEN, 2020; ZHAO; CHU; JIAO, 2019). Através da ação sobre miRNAs, circRNAs podem agir em diversos processos celulares, como processos metabólicos, desenvolvimento, resposta a estresses, dentre outros (ZHANG; LI; CHEN, 2020).

Além disso, estudos tem demonstrado que o processamento de circRNAs pode afetar o processamento de mRNAs correspondentes e regular a expressão dos seus genes de origem. Apesar dos mecanismos estarem melhor elucidados em humanos, a ação de elciRNAs na regulação gênica em plantas já foi identificada (ZHANG; LI; CHEN, 2020). Foi identificado que o circRNAs CircSEP3, originário do *Sepallata3*, é capaz de se ligar no seu gene parental formando um híbrido RNA:DNA, cuja força de ligação é muito maior do que a obtida com um RNA linear de mesma sequência. Essa estrutura pode levar à pausa de transcrição e alteração no *splicing* do gene (CONN et al., 2017). De forma contrária, estudos têm demonstrado que a expressão de alguns circRNAs exônicos apresentam correlação positiva com a expressão do seu gene de origem (SHAO et al., 2019; YE et al., 2015). Em humanos, a regulação positiva do gene parental por parte de ElciRNAs é realizado através da sua interação com U1 *small nuclear Ribonucleoprotein particle* (snRNP) e a RNAPII (LIU et al.,

2016), porém o mecanismo responsável por essa regulação não foi identificado em plantas.

Outras funções associadas com circRNAs em animais já foram relatadas. Evidências apontam que essas moléculas podem interagir com proteínas, aumentando sua função, auxiliar na interação enzima:substrato, e recrutá-las para localizações subcelulares específicas (KRISTENSEN et al., 2019; LAI et al., 2018; LU, 2020). Além disso, foi identificado que circRNAs contendo fases abertas de leitura com sítio interno de entrada no ribossomo, podem ser traduzidos em proteínas (ZHANG; LI; CHEN, 2020). Apesar de existir a possibilidade da ocorrência desses eventos em plantas, até o presente momento somente as funções de esponja de miRNAs e regulação da expressão gênica foram identificadas em plantas.

4.4 Silenciamento gênico em resposta a estresses bióticos

Para o desenvolvimento de estratégias de controle de *B. cinerea* baseadas no silenciamento gênico, é importante conhecer como esse mecanismo atua na resposta a estressores bióticos, para conhecer os miRNAs e circRNAs que são naturalmente produzidos no combate a patógenos. Embora estudos voltados para resposta a *B. cinerea* sejam escassos, estudos com outros patógenos já foram realizados e podem servir de base para estudos direcionados a *B. cinerea*.

4.4.1 miRNAs na resposta a infecções fúngicas em plantas

Na sua co-evolução com patógenos, plantas desenvolveram dois sistemas interdependentes para defesa contra patógenos: imunidade desencadeada por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs- do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), chamado de PTI (*PAMP-triggered immunity*), e imunidade desencadeada por efetores (ETI- do inglês, *Effector Triggered Immunity*), mediada por genes/proteínas de resistência (R), normalmente concomitante com resposta hipersensível (LI et al., 2014; XU; MENG; WISE, 2014). Enquanto o PTI se baseia no reconhecimento de PAMPs

através de receptores de membrana celular, ativando mecanismos que evitem a invasão, o ETI reconhece efetores, moléculas capazes de suprimir ação do PTI, enviados por patógenos através de receptores intracelulares. Assim, na interação planta-fungo, PTI e ETI oferecem a planta proteção pré-invasão e pós-invasão, respectivamente (LI et al., 2014).

Diversos estudos demonstram que sRNAs, incluindo miRNAs, estão associados com a regulação tanto de PTI quanto de ETI, atuando na defesa contra fungos e outros patógenos (LI et al., 2014). Foi demonstrado também que o controle desses sistemas através de miRNAs é conservado em plantas, uma vez que a ativação de ETI por proteínas R possui custos fisiológicos para a planta, portanto se faz necessária a sua regulação negativa na ausência de patógenos e ativação durante a infecção (SONG et al., 2019). Diversos miRNAs, em diferentes espécies vegetais, foram identificados por sua expressão diferencial na resposta a fungos: miR166, 393 e 400 em *Arabidopsis* (PARK et al., 2014; WONG et al., 2014); miR156, 159, 164, 168 e 393 em *Triticum aestivum* (trigo comum) (XIN et al., 2010); miR166, 393, 1507, 1508 e 2109 em *Glycine max* (soja) (WONG et al., 2014); membros das famílias miR160a/b/c/d/f, 164a/b/f e 167a/b/c em *Oryza sativa* (arroz) (LI et al., 2014). Os estudos e dados resultantes são abundantes, porém aqui serão apresentados a seguir alguns exemplos.

Yin *et al.* (2012) demonstrou regulação negativa dos miRNAs miR482, miR1444, e miR1448 mediante a infecção por *Verticillium dahliae* em raiz de duas cultivares de algodão, sendo uma resistente e outra suscetível a infecção por esse fungo (*Gossypium barbadense* e *Gossypium hirsutum*, respectivamente). Esses miRNAs tem como alvos os genes *polyphenol oxidase* (PPO) e R, ambos importantes na resposta a estresses bióticos e abióticos. Também foi observada a regulação negativa do miR2118, que atua sobre a *Toll/Interleukin-1 Receptor nucleotide-binding site-leucine-rich repeat* (TIR-NBS-LRR), uma proteína de resistência envolvida na regulação da patogenia de doenças. A supressão desse miRNAs então resulta no aumento da acumulação dessas proteínas de respostas a infecção e assim aumentando a imunidade celular.

Xu, Meng, Wise (2013) demonstraram que o miR398 é regulado pelos genes *Mildew resistance locus a (Mla)* e *Restoration of Mla resistance 1 (Rom1)* na resposta a *Blumeria graminis* por *Hordeum vulgare* L (cevada). A HvSOD1 é uma proteína presente em cloroplastos que realiza a conversão de O_2^- em H_2O_2 , EROs sinalizadores, o que pode indicar a possível atuação dessa enzima em respostas hipersensíveis. Os dados obtidos suportam a hipótese de que a expressão de *HvSOD1* é regulada por um *loop* coerente e um incoerente mediados por miR398. No *loop* coerente, *Mla*, gene de resistência ativado por efetores, leva a regulação positiva de *HvSOD1* através da inibição de miR398. No *loop* incoerente, *Rom1* inibe a expressão tanto do miR398 quanto do *HvSOD1*. Esse estudo, bem como outros, demonstram que a regulação mediada por miRNAs, bem como a regulação dos mesmos, é um processo complexo controlado por diferentes mecanismos.

Foram identificados por Li et al. (2014) diversos miRNAs associados com a regulação da resposta de arroz a infecção por *Magnaporthe oryzae*. Dentre os achados, foi demonstrado que o miR398b é induzido perante a infecção fúngica, enquanto os seus alvos *Os07g46990* (SOD2) e *Os04g48410* (codificante para uma chaperona de cobre para SOD). Foram então desenvolvidas duas linhagens transgênicas para superexpressão de miR398b. Ambas demonstraram resistência ao fungo, desenvolvendo sintomas mais brandos, menor massa fúngica, regulação positiva de genes de resistência e maior produção de H_2O_2 . Nessas linhagens foi identificada a indução positiva dos genes relacionados a PTI *OsKS4* e *OsNAC4*, bem como dos genes *OsPR1* e *OsPR10* perante a infecção e após tratamento com PAMPs, indicando que o miR398b possa estar regular positivamente tanto em respostas pré-invasão quanto pós-invasão.

Apesar do crescente interesse em miRNAs na comunidade científica, estudos relativos à atuação em resposta a *B. cinerea* ainda são escassos. Através de análises computacionais de bibliotecas de bibliotecas de pequenos RNAs de morangos cultivar 'Yanli' expostos a *B. cinerea*, Liang et al. (2018) identificaram 134 miRNAs conservados e 35 potencialmente novos miRNAs, bem como a expressão diferencial de 51 conservados e 35 novos miRNAs. Dentre estes, foram selecionados os miRNAs miR166, 167 e 5290 e os fanovel-018, 020 e 024, cujos genes alvos preditos são *HD-Zip*, *Auxin Response*

Factor (ARF), *Plant Intracellular Ras-group LRR* (PIRL), *Pentatricopeptide repeat* (PPR), genes *R* e *SQUAMOSA-promoter binding protein-like* (SPL), respectivamente. Esses genes estão associados também a resposta a estresses bióticos e abióticos através de diferentes mecanismos, o que reforça a atuação desses miRNAs na proteção contra o *B. cinerea*.

Wang et al. (2016) demonstraram que há transferência bidirecional de miRNAs em infecções por *B. cinerea*. Seus resultados demonstraram que *Arabidopsis* transgênicas para produção de pequenos RNAs contra DCL1 e DCL2 de *B. cinerea* sofrem lesões menores durante a infecção. Isso não somente sugere que há transferência de sRNAs da planta hospedeira para o fungo, como também que essas enzimas, essenciais no processamento de miRNAs e siRNA, atuam direta ou indiretamente no processo de infecção (WANG et al., 2016). No mesmo sentido, Zhang et al. (2016) demonstrou que plantas são capazes de exportar miRNAs endógenos para a célula do fungo infectante para o silenciamento de genes de virulência. Seus experimentos mostram o envio dos miR166 e 159 por algodão para o fungo *V. dahliae*, silenciando respectivamente os genes *Ca²⁺-dependent cysteine protease* (Clp-1) e *isotricondermin C-15 hydroxylase* (HiC-15), ambos essenciais para virulência. Posteriormente, Cai et al. (2018a) então demonstrou que a exportação de miRNAs entre *Arabidopsis* e *B. cinerea* é realizada mediante vesículas extracelular de plantas, em especial exossomos.

Cabe salientar também que nos estágios iniciais, *B. cinerea* utiliza sRNAs e proteínas efetoras para suprimir a morte celular prematura e respostas imunes, o que possibilita ao fungo estabelecer a infecção no hospedeiro e acumular biomassa para a fase sintomática (VELOSO; KAN, 2018). Esses sRNAs são translocados do fungo para a planta e utilizam o mecanismo de silenciamento da mesma para supressão de genes associados com a resposta imune (WEIBERG et al., 2013). O silenciamento dos genes *Dicer-like 1* (*dcl1*) e *dcl2* do *B. cinerea*, essenciais no processamento de sRNAs, através de plantas transgênicas para produção de miRNAs que possuem esses genes como alvos, demonstrou a transferência bilateral dessas moléculas e que sRNAs são necessários para a infecção efetiva pelo patógeno (WANG et al., 2016).

4.4.2 CircRNAs na resposta a estresses bióticos

Estudos demonstraram que circRNAs em plantas apresentam padrões de expressão específicos por tipo celular, tecido ou estágio do desenvolvimento e que a sua expressão pode ser induzida por diferentes estresses abióticos e estresses bióticos, como invasão por vírus, bactérias e fungos ou ataque por insetos, o que pode indicar que sejam essenciais no crescimento e desenvolvimento, bem como na resposta a estresses bióticos e abióticos em espécies vegetais (LITHOLDO; DA FONSECA, 2018; ZHANG; LI; CHEN, 2020; ZHAO; CHU; JIAO, 2019). Até o momento, ainda não foram publicados estudos demonstrando a resposta de plantas a *B. cinerea* com foco na expressão de RNA circulares, porém estudos voltados para outros patógenos podem servir de base para estudos futuros.

O trabalho realizado por Sun et al. (2016), no estudo da interação planta-patógeno entre *Arabidopsis thaliana* e a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. tomato, foi o primeiro a identificar circRNAs sob estresse biótico; porém no mesmo não foi identificada expressão diferencial ou função biológica dessas moléculas. Outro estudo, conduzido por Wang et al. (2017), demonstrou a expressão diferencial de circRNAs por *Actinidia chinensis* (kiwi) em resposta à infecção por *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Foram identificados 584 circRNAs expressos diferencialmente, dos quais grupos específicos estão diretamente associados com genes de defesa R e PPR.

Zhao et al. (2017b) identificou 199 circRNAs diferencialmente expressos por *Glycine soja* Sieb. et Zucc (soja selvagem) em resposta ao dano por mastigação causado por *Helicoverpa armigera* Hübner, um inseto desfolhador. Os genes originários dessas moléculas apresentam diversas funções, dentre elas o aumento da biossíntese de monoterpenoides e alcaloides tropano, piridina e piperidina, moléculas associadas à defesa contra insetos e outros animais herbívoros. Além disso, 106 dos 199 circRNAs apresentaram locais de ligação com miRNAs, podendo assim agir como esponjas.

Em *Solanum tuberosum* (batata) foram identificados, por Zhou et al (2018), 429 circRNAs expressos de forma específica em resposta a infecção por

Pectobacterium carotovorum, subespécie *brasiliens*, um patógeno bacteriano emergente. As análises demonstraram que os genes de origem (parentais) estão especialmente associados com resposta de defesa, metabolismo da parede celular e metabolismo energético. Além disso, 138 circRNAs apresentaram sítios de ligação com miRNAs, sendo 120 miRNAs potenciais alvos dessas moléculas.

Em linhagens derivadas de cruzamentos interespecíficos de *Gossypium hirsutum* e *Gossypium barbadense* (duas variantes de algodão), foram identificados 280 circRNAs expressos diferencialmente entre raiz e tronco em resposta a infecção por *V. dahliae* (XIANG et al., 2018). Observou-se que parte dos genes de origem são da classe NBS, que estão associados com o reconhecimento de efetores de patógenos, atuando assim na defesa ETI (XIANG et al., 2018).

Wang et al. (2018) buscou por circRNAs e lncRNAs em *Solanum lycopersicum* (tomate) sob infecção por *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Nesse estudo foram identificados um total de 184 circRNAs, dos quais 32 e 83 foram expressos especificamente no grupo controle e no grupo tratado com vírus, respectivamente. O grupo de pesquisa então silenciou o gene *Solyc07g043420.2.1*, do qual se origina o circRNA Slcirc107, para avaliar a associação de ambos com a infecção e observou que o silenciamento levou a um fenótipo de resistência e menor acúmulo de RNA viral. Nesse estudo também foi realizada a busca por circRNAs capazes de atuar como esponjas de miRNA, porém nenhum foi encontrado.

No estudo realizado por Ghorbani et al. (2018) foram identificados 160 circRNAs diferencialmente expresso em *Zea mays L.* (milho) em resposta a infecção por *Maize Iranian mosaic virus* (MIMV). A busca por possíveis esponjas de miRNAs identificou 33 circRNAs que possivelmente possuem essa função, porém a função da maioria dos miRNAs alvos não é conhecida. Dentre os miRNAs alvos estão os miR399, 172 e 160, que regulam um transportador de fosfato, fator de transcrição associado com desenvolvimento floral e possivelmente genes de fatores de resposta a auxinas, respectivamente. A busca da função dos genes parentais dos circRNAs identificados demonstrou

que os principais processos biológicos afetados foram a regulação do metabolismo de glutamato e resposta a estímulos.

Recentemente, Fan et al. (2020) encontrou 636 circRNAs expressos especificamente na resposta ao patógeno fúngico *M. oryzae* em *Oryza sativa* (arroz). A análise funcional demonstrou que os genes parentais estão principalmente associados com diversas vias de resposta a estressores, como biossíntese de metabólitos secundários, exportação de proteínas e biossíntese de esqueletos carbônicos de terpenóides. Foi identificado também que plantas com fenótipo de resistência demonstram maior diversidade de circRNAs, originários de *splicings* alternativos diferentes e processos de *splicing* mais complexos. Para confirmar o envolvimento de circRNAs na resposta ao fungo, foi realizada a super expressão do circR5g05160, uma das moléculas expressas em maior quantidade em plantas resistentes. As plantas modificadas mostraram maior expressão basal de genes associados com PTI e ETI, indicando que esse circRNA possa estar associado com esses mecanismos de defesa.

4.4.3 Uso de silenciamento gênico no controle de doenças fúngicas

Devido aos seus mecanismos intrínsecos de silenciamento de mRNAs para redução dos níveis de proteínas alvos, o PTGS pode ser utilizado para a regulação das respostas de defesa de plantas, bem como para interferir diretamente no patógeno, através da inibição de fatores de virulência, fatores de resistência e processos celulares diversos (CAI et al., 2018; ZOTTI et al., 2018). A aplicação desse mecanismo pode ser realizado através da entrega de dsRNAs ou sRNAs (como miRNAs e *small interfering RNAs* (siRNAs)) por vias transformativas e vias não transformativas (CAGLIARI, 2021). A indução de silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (HIGS- do inglês, *Host-induced gene silencing*) é uma técnica transformativa baseada em PTGS baseada na expressão de dsRNAs na planta hospedeira, com o objetivo de silenciar genes alvos no patógeno (SANG; KIM, 2020). A planta transgênica então produz o dsRNA e siRNAs, que chegarão as células do patógeno para o silenciamento dos seus genes, protegendo a planta hospedeira (NOWARA et al., 2010; NUNES; DEAN, 2012; QI et al., 2019a). A utilização de HIGS já se provou bem

sucedida no controle de pragas, porém a quantidade de tempo necessária e os custos associados com o desenvolvimento de plantas transgênicas são consideravelmente altos, passam por processos governamentais regulatórios complexo e, além disso, a produção constante de dsRNAs pelo hospedeiro aumenta a pressão de seleção, aumentando os riscos do surgimento de linhagens resistentes (CAGLIARI, 2021; QI et al., 2019a; SANG; KIM, 2020; ZOTTI et al., 2018).

Métodos não transformativo, por sua vez, podem ser desenvolvidos de forma mais rápida e barata, inclusive para aplicação em mais de uma espécie vegetal, são mais facilmente aceitos por órgãos regulamentadores e pelo público, e, devido à liberação transiente de dsRNAs, o desenvolvimento de resistência por parte dos patógenos é mais lento (CAGLIARI, 2021). RNAs podem se translocar através de tecidos vasculares da planta, dessa forma a aplicação tópica, como em folhas ou no solo para absorção pelas raízes, pode ser utilizada para o controle sistêmico de pragas (ANDRADE; HUNTER, 2016; HUNTER et al., 2012; MELNYK; MOLNAR; BAULCOMBE, 2011; YOON; KIM; PALLI, 2020). O método de silenciamento gênico induzido por pulverização (SIGS- do inglês, *Spray-induced gene silencing*) é um método não transformativo no qual dsRNAs são aplicados por aspersão na superfície da planta, dessa forma a planta pode absorver o dsRNA e o processar para entrega nas células do patógeno, ou o próprio patógeno pode capturar a molécula e utilizar seu próprio mecanismo de silenciamento (SANG; KIM, 2020). Um dos principais desafios dessa metodologia é manter a estabilidade das moléculas na formulação, pois uma vez aplicado o produto, os RNAs estarão expostos às condições ambientais como radiação, temperatura, pH e enzimas secretadas. Com os avanços da nanotecnologia, esse problema pode ser minimizado através da proteção dos dsRNAs com nanopartículas, como demonstrado por Mitter et al. (2017). O grupo adsorveu as moléculas de dsRNA em nanofolhas de argila com camada dupla de hidróxido, que além de proteger as moléculas, promove a liberação controlada da mesma, aumentando o efeito da aplicação de 5 a 7 dias, para 20 dias (MITTER et al., 2017).

O silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS- do inglês, *virus-induced gene silencing*) é um método transformativo transiente que promove a mesma

dinâmica de defesa utilizada em transformações estáveis, gerando o que pode ser chamado de HIGS mediado por vírus, porém sem alterar o genoma da planta hospedeira (CHEN et al., 2016b; PANWAR; MCCALLUM; BAKKEREN, 2013). Essa metodologia, comumente utilizada em estudos de função gênica, além de ser utilizada como produto para controle de pragas, pode também ser aplicada para a verificação inicial da funcionalidade de moléculas interferentes, antes que protocolos de transformação para HIGS sejam realizados (PANWAR et al., 2018; PANWAR; MCCALLUM; BAKKEREN, 2013).

Alguns trabalhos já demonstraram a utilização bem sucedida de PTGS, tanto por metodologias transformativas, quanto por não transformativas, no controle de patógenos fúngicos, incluindo *B. cinerea* (ver Quadro 3). Por exemplo, Song et al. (2018) demonstrou que a aplicação de dsRNA para inibição de *Myosin 5 (Myo5)* em *Fusarium asiaticum*, pode ser utilizada no controle deste patógeno. Mutações no gene *Myo5* conferem resistência ao fenamacril (FRAC 47) em *Fusarium spp.*, dessa forma o grupo hipotetizou que mudanças na expressão desse gene alterariam a sensibilidade do patógeno ao fungicida (SONG et al., 2018). No trabalho foi demonstrado que dsRNA foi capaz de causar mudanças morfológicas nos micélios, além de reduzir a resistência do fungo ao fenamacril tanto *in vitro*, quanto *in vivo* ao ser pulverizado sobre o trigo, diminuindo assim a quantidade de fungicida necessária para o controle do patógeno (SONG et al., 2018). O dsRNA baseado no gene *β 2-tubulin* de *F. asiaticum*, aplicado através de pulverização, apresentou atividade fúngica, não somente contra este patógeno, como também contra *B. cinerea*, *M. oryzae* e *Colletotrichum truncatum* em diferentes plantas hospedeiras, com um efeito adicional de redução de resistência ao fungicida carbendazim (FRAC 1) (GU et al., 2019). Até o presente momento, não há métodos amplamente aplicados que revertam rapidamente o fenótipo de resistência de patógenos fúngicos, porém esses trabalhos demonstram que PTGS pode ser eficientemente aplicado para esse fim.

Quadro 3 - Aplicação de métodos transformativos e não transformativos baseados em PTGS no controle de patógenos fúngicos.

Patógeno	Gene alvo	Método	Planta	Referência
<i>Blumeria graminis</i>	<i>Avra10</i>	HIGS	<i>Hordeum vulgare</i> (cevada)	Nowara et al. (2010)

<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	<i>SvrPm3</i> ^{a1/f1} <i>Bgt_Bcg-6</i> <i>Bgt_Bcg-7</i>	HIGS	<i>Triticum aestivum</i> (trigo comum)	Schaefer et al., (2020)
<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	<i>PsCNA1</i> <i>PsCNB1</i>	VIGS	<i>Triticum aestivum</i> (trigo comum)	Zhang et al. (2012)
<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	<i>PsCPK1</i>	VIGS HIGS	<i>Triticum aestivum</i> (trigo comum)	Qi et al. (2018)
<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	<i>PstGSRE1</i>	VIGS HIGS	<i>Triticum aestivum</i> (trigo comum)	Qi et al., (2019b)
<i>Puccinia triticina</i>	<i>PtMAPK1</i> <i>PtCYC1</i> <i>PtCNB</i>	VIGS e (HIGS mediado por BSMV)	<i>Triticum aestivum</i> (trigo comum)	Panwar; McCallum; Bakkeren (2013)
<i>Puccinia triticina</i>	<i>PtMAPK1</i> , <i>PtCYC1</i>	HIGS	<i>Triticum aestivum</i> (trigo comum)	Panwar et al. (2018)
<i>Fusarium graminearum</i>	<i>CYP51</i>	HIGS	<i>Hordeum vulgare</i> (cevada) <i>Arabidopsis thaliana</i>	Koch et al. (2013)
<i>Fusarium graminearum</i>	<i>CYP51</i>	SIGS	<i>Hordeum vulgare</i> (cevada)	Koch et al. (2016)
<i>Fusarium graminearum</i>	<i>CYP51</i>	SIGS	<i>Hordeum vulgare</i> (cevada)	Höfle et al. (2020)
<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Chs3b</i>	HIGS	<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	Cheng et al. (2015)
<i>Fusarium culmorum</i>	<i>FcFgl1</i> <i>FcFmk1</i> <i>FcGls1</i>	VIGS HIGS	<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	Chen et al. (2016b)
<i>Fusarium asiaticum</i>	<i>Myo5</i>	SIGS	<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	Song et al. (2018)
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>ERG6</i> <i>ERG11</i>	HIGS	<i>Musa</i> AAA 'Cavendish'	Dou et al. (2020)
<i>Verticillium dahlia</i>	<i>Vd-DCL1</i> <i>Vd-DCL2</i>	HIGS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Wang et al. (2016)
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Bc-DCL1</i> <i>Bc-DCL2</i>	SIGS	<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate)	

			<i>Fragaria ananassa</i> × (morango) <i>Vitis labrusca</i> (uva) <i>Lactuca sativa</i> (alface) <i>Allium cepa</i> L. (cebola) <i>Rosa hybrida</i> L. (rosa) <i>Arabidopsis thaliana</i>	
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	59 genes	SIGS	<i>Brassica napus</i> 'Westar' (canola)	McLoughlin et al. (2018)
<i>Botrytis cinerea</i>	8 genes			
<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>MoABC1</i> <i>MoMAC1</i> <i>MoPMK1</i>	VIGS (HMV)	<i>Oryza sativa</i> (arroz)	Zhu et al. (2017)
<i>Verticillium dahlia</i>	<i>Ave1</i> <i>Sge1</i> <i>NLP1</i>	VIGS	<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate),	Song; Thomma (2018)
		HIGS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
<i>Fusarium asiaticum</i>	β 2-tubulin	SIGS	<i>Triticum aestivum</i> L. (trigo comum)	Gu et al. (2019)
<i>Botrytis cinerea</i>			<i>Cucumis sativus</i> L. (pepino)	
<i>Magnaporthe oryzae</i>			<i>Hordeum vulgare</i> L. (cevada)	
<i>Colletotrichum truncatum</i>			<i>Glycine max</i> L. (soja)	

Nome ou descrição dos genes: *Host-induced gene silencing* (HIGS), *Spray-induced gene silencing* (SIGS); *Virus-induced gene silencing* (VIGS); *Avirulence (Avra10)*; *CalciNeurin A 1* (PsCNA1), *CalciNeurin B 1* (PsCNB1); *Protein kinase A catalytic subunit* (PsCPK1); *Glycine-serine-rich effector* (PstGSRE1); *Mitogen-activated protein kinase* (PtMAPK1); *Cyclophilin* (PtCYC1); *CalciNeurin B* (PtCNB); *Cytochrome P450 lanosterol C-14 α -demethylase* (CYP51); *Chitin Synthase 3* (*Chs3b*); gene codificante para uma lipase secretada (*FcFgl1*); gene codificante para uma *Mitogen-activated protein kinase* (*FcFmk1*); *Glutaminase 1* (*FcGls1*); *Myosin 5* (*Myo5*); gene codificante para *C-24 sterol methyltransferase* (*ERG6*); gene codificante para *Cytochrome P450 lanosterol C-14 α -demethylase* (*ERG11*); *Dicer-like 1* (*Bc-DCL1* e *Vd-DCL1*); *Dicer-like 2* (*Bc-DCL2* e *Vd-DCL2*); *ATP-binding cassette 1* (*MoABC1*); *Membrane-bound Adenylate Cyclase* (*MoMAC1*); *Mitogen-activated Protein Kinase* (*MoPMK*); *Avirulence on Ve 1* (*Ave1*); *SIX Gene Expression 1* (*Sge1*); *Necrosis and Ethylene inducing-like Protein 1* (*NLP1*).

O gênero *Puccinia* é alvo de diversos estudos de controle, pois patógenos desse gênero são alguns dos principais causadores de ferrugem em cereais

(PANWAR et al., 2018, 2018; QI et al., 2018, 2019b; SANG; KIM, 2020; ZHANG et al., 2012). Um trabalho realizado por Qi et al. (2019b) identificou uma *Glycine-serine-rich effector* (*PstGSRE1*) de *Puccinia striiformis f. sp. tritici* capaz de suprimir a morte celular programada, através da sua interação com uma proteína de zinco *Lesions Simulating Disease resistance-one-like 2* (*TaLOL2*) no trigo. O grupo utilizou PTGS, através de VIGS e HIGS (trigo transgênico) para silenciar o gene *PstGSRE1*, o que resultou em menor virulência do patógeno e maior acúmulo de H₂O₂ no trigo (QI et al., 2019b).

Koch et al. (2013) demonstrou maior resistência de *Arabidopsis thaliana* e cevada transgênicas ao fungo *Fusarium graminearum* através da produção de dsRNA *CYP3RNA* de 791 nucleotídeos, que possui como alvos 3 genes parálogos da *cytochrome P450 lanosterol C-14 α -demethylase* (*CYP51*), *CYP51A*, *CYP51B* e *CYP51C*, que mediam diferencialmente a sensibilidade do patógeno a fungicidas inibidores de biossíntese de esterol. Essa aplicação de HIGS levou a inibição quase completa da doença, limitando o micélio fúngico ao local de infecção (KOCH et al., 2013). Posteriormente, Koch et al. (2016) demonstrou que a utilização tópica em cevada por SIGS desse mesmo dsRNA promoveu o controle desse patógeno em áreas pulverizadas e não pulverizadas, através do deslocamento da molécula pelo sistema vascular da planta e captura do dsRNA pelo patógeno, utilizando a própria maquinaria de silenciamento. Em uma análise comparativa, foi observado que aplicações por SIGS de diferentes dsRNAs, incluindo o *CYP3RNA*, com alvos nos genes *CYP51*, foram mais efetivas na redução do crescimento fúngico, do que a utilização das mesmas moléculas por HIGS (KOCH et al., 2019). Mais recentemente, Höfle et al. (2020) avaliou a eficiência de diferentes tamanhos de dsRNAs no silenciamento de *CYP51* por HIGS e SIGS. Embora não tenha sido observada correlação entre o tamanho da molécula e a redução da infecção em *A. thaliana* transgênica, a pulverização com dsRNAs de 400-500 nucleotídeos, contra cada um dos genes separadamente, ofereceram melhores resultados que dsRNAs de outros tamanhos, porém não superiores que a pulverização com o *CYP3RNA* (HÖFLE et al., 2020; KOCH et al., 2019).

O trabalho realizado por Wang et al. (2016), previamente mencionado, demonstrou pela primeira vez o PTGS bidirecional entre reinos e translocação

de sRNAs entre a planta hospedeira e o fungo patogênico. Nesse trabalho foram utilizadas *A. thaliana* transgênicas *Bc-DCL1/2-dsRNAs* (com genes *Bc-DCL1* e *Bc-DCL2* de *B. cinerea*), bem como aplicações tópicas de *Bc-DCL1/2-dsRNAs* e *Bc-DCL1/2-sRNAs* em tomates, morangos, uvas, alface, cebolas, pétalas de rosa e folhas de *A. thaliana* (WANG et al., 2016). Em todos os experimentos, essas moléculas inibiram o crescimento do fungo e desenvolvimento de sintomas nos tecidos, demonstrando que a maquinaria de silenciamento, em especial as DCL fúngicas, podem ser bons alvos no controle de fungos patogênicos (WANG et al., 2016). Foram então geradas *A. thaliana* transgênicas para a produção de sRNAs com alvos nas *Vd-DCL1* e *Vd-DCL2* de *V. dahlia*, além de *Bc-DCL1/2-sRNAs*, que apresentaram resistência a ambos patógenos, indicando que PTGS poderia ser utilizado para controlar duas doenças fúngicas simultaneamente (WANG et al., 2016). É interessante salientar que as moléculas utilizadas só afetam os genes para os quais foram determinados, sem afetar as DCLs do outro patógeno ou das plantas hospedeiras.

Até o presente momento, não há estudos que demonstrem a utilização de circRNAs como forma de controle de pragas. Não foram encontrados estudos que comprovem a transferência entre reinos de circRNAs, tão pouco a captura dessas moléculas presentes no ambiente por células fúngicas, de forma como acontece com dsRNAs, siRNAs e miRNAs. Porém, devido à sua grande estabilidade, quando comparada a moléculas lineares, os circRNAs podem se apresentar futuramente como uma alternativa no controle de *B. cinerea* e outras pragas fúngicas.

4.4.4 Aspectos de segurança do uso agrícola de PTGS

O uso de metodologias baseadas em RNAi se apresenta como uma alternativa ecologicamente amigável, quando comparado com outros métodos de proteção agrícola, porém é necessário o monitoramento dos seus riscos para o ambiente e a saúde humana. Os principais riscos associados com o uso de PTGS podem ser categorizados como silenciamento de genes não alvos, silenciamento de genes em espécies não alvos, saturação da maquinaria de PTGS e estimulação imune (ZOTTI et al., 2018).

O mecanismo de ação de PTGS se baseia especificamente na complementariedade da molécula interferente com o seu mRNA alvo, o que permite o desenho de dsRNAs com altíssima especificidade, através da utilização de genes pouco conservados como alvos, e a aplicação de ferramentas de bioinformática, como o alinhamento das sequências de interesse com os genomas disponíveis em bancos de dados para verificação de homologia entre sequências (CHENG et al., 2015; WANG et al., 2016). Porém, metodologias baseadas em bioinformática podem resultar em superestimação da probabilidade de organismos não alvo serem afetados, pois, a molécula interferente pode não ativar os mecanismos de silenciamento por diversos motivos, como: a molécula interferente pode não ser captada ou pode não ser transportada para a célula onde o gene não alvo é expresso e a degradação do transcrito não alvo pode não ter impacto, devido à redundância da função do gene ou outros fatores (FLETCHER et al., 2020). Além disso, desconhecimento do genoma de diversas espécies, principalmente da fauna, flora e microbiota no local de aplicação dessas metodologias pode mascarar o risco de interações não previstas e limitar a determinação dos reais riscos de aplicação naquele ambiente. Porém com redução rápida dos custos de sequenciamento e aumento da quantidade de dados publicados, esse fator tende a se tornar um problema cada vez menor (FLETCHER et al., 2020; ZOTTI et al., 2018). Portanto, para que os possíveis riscos que a aplicação de PTGS podem causar ao ambiente sejam minimizados, as análises de biossegurança devem ser realizadas de forma local, considerando a fauna, flora e microbiota do ambiente em que essas metodologias serão empregadas.

Pouco se sabe sobre os riscos que o uso de moléculas interferentes pode ter na saúde humana, porém até o momento os mesmos parecem ser baixos. As principais vias de exposição de seres humanos a dsRNAs são inalação, ingestão e dermal, o que conseqüentemente significa que essas moléculas seriam expostas a diversas barreiras biológicas redundantes, diferentes condições ambientais, bem como a células do sistema imune inato e enzimas secretadas, além de serem rapidamente excretadas por vias renais, diminuindo consideravelmente os riscos de efeitos da ativação de vias de silenciamento, (DEWITTE-ORR et al., 2009; FLETCHER et al., 2020; JENSEN et al., 2013;

WHITEHEAD et al., 2011). Contudo, é importante a verificação cuidadosa da segurança dessas moléculas e o monitoramento dos seus possíveis efeitos na população que os consumir.

No que se refere a circRNAs, muito pouco se sabe quanto aos possíveis efeitos do consumo e exposição a essas moléculas em humanos, tão pouco as consequências ambientais que seu uso pode causar. Em mamíferos foi identificado que essas moléculas podem ser exportados através de exossomos para diversos fluidos corporais, como sangue e saliva (FANALE et al., 2018). O mesmo comportamento ainda não foi observado em plantas, porém se acredita na possibilidade de que circRNAs possam ser transportadas entre células e por longas distâncias via xilema e floema (LI et al., 2017). Como mencionado anteriormente, não há estudos que demonstrem a transferência entre reinos de circRNAs, tão pouco evidências de que haja captação de moléculas ambientais, como ocorre com dsRNAs, miRNAs e siRNA. Dessa forma, é importante que esses estudos sejam realizados, para a averiguação dos impactos ambientais nos quais o uso dessas moléculas pode acarretar.

5 Conclusões e perspectivas

Os métodos transformativos e não transformativos baseados no silenciamento gênico pós-transcricional são ferramentas que já vem apresentando resultados interessantes no controle de algumas pragas agrícolas, porém ainda se trata de uma tecnologia em ascensão. Enquanto a elucidação aos processos do ciclo biológico e modos de atuação de miRNAs e circRNAs é um importante passo na otimização na aplicação de metodologia de controle, a descoberta de moléculas endógenas atuantes na resposta a patógenos pode oferecer respostas quanto ao seu papel em mecanismos de defesa, bem como oferecer um maior arsenal para utilização no combate ao mofo cinzento.

O *B. cinerea* apresenta diversos mecanismo patogênicos e fatores de virulência que o tornam altamente adaptável ao ambiente e aos seus hospedeiros. Devido à sua plasticidade gênica, o desenvolvimento de linhagens resistentes aos métodos de controle químicos e biológicos atualmente aplicados é um grande desafio a ser superado, sendo necessárias novas abordagens de

combate a esse patógeno. O silenciamento gênico pode ser aplicado para afetar processos celulares do patógeno, inibição de fatores de virulência e resistência, e modular os mecanismos de defesa da planta hospedeira, sendo assim uma ferramenta de grande potencial.

Apesar de consideráveis avanços relativos aos estudos com miRNAs, bem como sua eventual aplicação contra estressores bióticos, incluindo o *B. cinerea*, muito ainda se tem a descobrir sobre os processos de biogênese e mecanismos regulatórios de circRNAs em plantas antes da sua possível aplicação prática em metodologias de controle. Alguns estudos demonstram que os circRNAs atuam de forma direta ou indireta na resposta a estresses bióticos, como vírus, bactérias, fungos e insetos, porém, até o presente momento, não há estudos publicados sobre a atuação de circRNAs perante o contato com *B. cinerea*.

Dessa forma, mais estudos de ciência básica relativa a miRNAs e circRNAs se fazem necessários para o desenvolvimento de metodologias transformativas e não transformativas baseadas no silenciamento gênico pós-transcricional no controle de *B. cinerea*, que sejam viáveis, seguras e efetivas.

Referências

- ACHKAR, N. P.; CAMBIAGNO, D. A.; MANAVELLA, P. A. miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 12, p. 1034–1044, dez. 2016.
- AHMADU, T. et al. Antifungal efficacy of Moringa oleifera leaf and seed extracts against Botrytis cinerea causing gray mold disease of tomato (Solanum lycopersicum L.). **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 4, p. 1007–1022, dez. 2021.
- AHMED, S. et al. Effects of Different Sulfur Dioxide Pads on Botrytis Mold in 'Italia' Table Grapes under Cold Storage. **Horticulturae**, v. 4, n. 4, p. 29, dez. 2018.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- AMSELEM, J. et al. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens Sclerotinia sclerotiorum and Botrytis cinerea. **PLOS Genetics**, v. 7, n. 8, p. e1002230, 18 ago. 2011.
- ANDRADE, E. C. DE; HUNTER, W. B. **RNA Interference – Natural Gene-Based Technology for Highly Specific Pest Control (HiSPeC)**. [s.l.] IntechOpen, 2016.
- ARAB, M. M. et al. Modeling and Optimizing a New Culture Medium for In Vitro Rooting of GxN15 Prunus Rootstock using Artificial Neural Network-Genetic Algorithm. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9977, 2 jul. 2018.
- ARENAS, Y. C. et al. Functional analysis and mode of action of phytotoxic Nep1-like proteins of Botrytis cinerea. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 5–6, p. 376–386, 2010.
- BAI, B. et al. miR393-Mediated Auxin Signaling Regulation is Involved in Root Elongation Inhibition in Response to Toxic Aluminum Stress in Barley. **Plant and Cell Physiology**, jan. 2017.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. St. Paul: American Phytopathological Society (APS Press), 1998.
- BARRALES-LÓPEZ, A. et al. Improved in vitro rooting and acclimatization of Capsicum chinense Jacq. plantlets. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**, v. 51, n. 3, p. 274–283, 2015.
- BÉLANGER, M.-C. et al. Autofluorescence of grape berries following Botrytis cinerea infection. **International Journal of Remote Sensing**, v. 32, n. 14, p. 3835–3849, 20 jul. 2011.

BERNARD, B. K.; GORDON, E. B. An Evaluation of the Common Mechanism Approach to the Food Quality Protection Act: Captan and Four Related Fungicides, a Practical Example. **International Journal of Toxicology**, v. 19, n. 1, p. 43–61, 1 jan. 2000.

BHAT, S. S. et al. mRNA adenosine methylase (MTA) deposits m6A on pri-miRNAs to modulate miRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 35, p. 21785–21795, 1 set. 2020.

BIKA, R.; BAYSAL-GUREL, F.; JENNINGS, C. Botrytis cinerea management in ornamental production: a continuous battle. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 0, n. 0, p. 1–21, 27 ago. 2020.

BILKISS, M.; SHIDDIKY, M. J. A.; FORD, R. Advanced Diagnostic Approaches for Necrotrophic Fungal Pathogens of Temperate Legumes With a Focus on Botrytis spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

BINDER, M. **Development of a Botrytis specific immunosensor: towards using PCR species identification**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) School of Engineering, Cranfield University, 2014.

BLANCO-ULATE, B. et al. Genome-wide transcriptional profiling of Botrytis cinerea genes targeting plant cell walls during infections of different hosts. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 2014.

BLANCO-ULATE, B. et al. Hitting the Wall: Plant Cell Walls During Botrytis cinerea Infections. In: FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Eds.). **Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 361–386.

BŁASZKOWSKI, J. et al. **Saprotrophic, Pathogenic, and Symbiotic Fungi of Poland**. Disponível em: <<http://www.zor.zut.edu.pl/Mycota/Botrytis%20cinerea.html>>. Acesso em: 2 maio. 2021.

BOLOGNA, N. G. et al. Nucleo-cytosolic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway. **Molecular Cell**, v. 69, n. 4, fev. 2018.

BRANSCHIED, A. et al. SKI2 mediates degradation of RISC 5'-cleavage fragments and prevents secondary siRNA production from miRNA targets in *Arabidopsis*. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 22, p. 10975–10988, 15 dez. 2015.

BRISTOW, P. R.; MCNICOL, R. J.; WILLIAMSON, B. Infection of strawberry flowers by Botrytis cinerea and its relevance to grey mould development. **Annals of Applied Biology**, v. 109, n. 3, p. 545–554, 1986.

BRITO, N.; ESPINO, J. J.; GONZÁLEZ, C. The endo-beta-1,4-xylanase xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 19, n. 1, p. 25–32, jan. 2006.

BRODERSEN, P. et al. Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. **Science**, v. 320, n. 5880, maio 2008.

BROUWER, M. et al. Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, n. 2, p. 241–248, 1 nov. 2003.

BUDAK, H.; AKPINAR, B. A. Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins. **Functional & Integrative Genomics**, v. 15, n. 5, set. 2015.

BULGER, M. A.; ELLIS, M. A.; MADDEN, L. V. Influence of Temperature and Wetness Duration on Infection of Strawberry Flowers by *Botrytis cinerea* and Disease Incidence of Fruit Originating from Infected Flowers. **Phytopathology**, v. 77, n. 8, p. 1225, 1987.

CAGLIARI, D. **Transcriptome analysis and exploring RNAi and CRISPR in the Neotropical stink bug, *Euschistus heros***. Tese (Doutorado) - Department of Plants and Crops, Ghent University, p. 221. 2021.

CAI, Q. et al. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 360, n. 6393, p. 1126–1129, 8 jun. 2018a.

CAI, Q. et al. Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi—nature's blueprint for modern crop protection strategies. **Current Opinion in Microbiology**, Host Microbe Interactions: Fungi * Host Microbe Interactions: Parasitology. v. 46, p. 58–64, 1 dez. 2018b.

CAMBIAGNO, D. A. et al. HASTY modulates miRNA biogenesis by linking pri-miRNA transcription and processing. **Molecular Plant**, v. 14, n. 3, p. 426–439, 1 mar. 2021.

CARISSE, O. Epidemiology and Aerobiology of *Botrytis* spp. In: FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Eds.). **Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 127–148.

CELIK, M. et al. Quantitative and qualitative analysis of *Botrytis* inoculated on table grapes by qPCR and antibodies. **Postharvest Biology and Technology**, v. 52, n. 2, p. 235–239, 1 maio 2009.

CHANDRA, S. et al. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 9, p. 1199–1205, 1 set. 2010.

CHEN, L. et al. PcircRNA_finder: a software for circRNA prediction in plants. **Bioinformatics**, v. 32, n. 22, p. 3528–3529, 15 nov. 2016a.

CHEN, L. et al. Circular RNAs mediated by transposons are associated with transcriptomic and phenotypic variation in maize. **New Phytologist**, v. 217, n. 3, p. 1292–1306, 2018.

CHEN, W. et al. Host-induced silencing of *Fusarium culmorum* genes protects wheat from infection. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 17, p. 4979–4991, set. 2016b.

CHEN, X. Small RNAs and Their Roles in Plant Development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 25, n. 1, nov. 2009.

CHENG, W. et al. Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 9, p. 1335–1345, 2015.

CHU, Q. et al. PlantcircBase: A Database for Plant Circular RNAs. **Molecular Plant**, v. 10, n. 8, p. 1126–1128, 7 ago. 2017.

CHU, Q. et al. Characteristics of plant circular RNAs. **Briefings in Bioinformatics**, v. 21, n. 1, p. 135–143, 17 jan. 2020.

CILIBERTI, N. et al. Environmental Conditions Affect *Botrytis cinerea* Infection of Mature Grape Berries More Than the Strain or Transposon Genotype. **Phytopathology**, v. 105, n. 8, p. 1090–1096, 28 jul. 2015.

CINQUANTA, L. et al. Rapid Assessment of Gray Mold (*Botrytis cinerea*) Infection in Grapes with a Biosensor System. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 66, n. 4, p. 502–508, 1 nov. 2015.

COCQUERELLE, C. et al. Mis-splicing yields circular RNA molecules. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 1, p. 155–160, 1993.

COLLADO, I. G.; VIAUD, M. Secondary Metabolism in *Botrytis cinerea*: Combining Genomic and Metabolomic Approaches. In: FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Eds.). **Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 291–313.

COLMENARES, A. J. et al. The Putative Role of Botrydial and Related Metabolites in the Infection Mechanism of *Botrytis cinerea*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 5, p. 997–1005, 1 maio 2002.

CONN, V. M. et al. A circRNA from *SEPALLATA3* regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation. **Nature Plants**, v. 3, n. 5, p. 1–5, 18 abr. 2017.

CORBETT, J. R.; WRIGHT, K.; BAILLIE, A. C. **The biochemical mode of action of pesticides**. 2nd ed ed. London ; Orlando: Academic Press, 1984.

CUI, D.-L. et al. Genome-wide identification and characterization of DCL, AGO and RDR gene families in *Saccharum spontaneum*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 13202, 6 ago. 2020.

CUI, Y.; FANG, X.; QI, Y. TRANSPORTIN1 Promotes the Association of MicroRNA with ARGONAUTE1 in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 28, n. 10, p. 2576–2585, 1 out. 2016.

CUTLER, H. G. et al. Botcinolide: A Biologically Active Natural Product from *Botrytis cinerea*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, n. 11, p. 1980–1982, 1 jan. 1993.

CUTLER, H. G. et al. Homobotcinolide: a biologically active natural homolog of botcinolide from *Botrytis cinerea*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, n. 4, p. 656–658, abr. 1996.

DALMAIS, B. et al. The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 6, p. 564–579, ago. 2011.

DARBANI, B.; NOEPARVAR, S.; BORG, S. Identification of Circular RNAs from the Parental Genes Involved in Multiple Aspects of Cellular Metabolism in Barley. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

D'ARIO, M.; GRIFFITHS-JONES, S.; KIM, M. Small RNAs: Big Impact on Plant Development. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 12, dez. 2017.

DAVIDSON, J. A. et al. Biology and Management of *Botrytis* spp. in Legume Crops. In: ELAD, Y. et al. (Eds.). . **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 295–318.

DE MEYER, G. et al. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, n. 3, p. 279–286, 1 abr. 1998.

DE SIMONE, N. et al. *Botrytis cinerea* and Table Grapes: A Review of the Main Physical, Chemical, and Bio-Based Control Treatments in Post-Harvest. **Foods**, v. 9, n. 9, p. 1138, set. 2020.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–430, maio 2012.

DEWEY, F. M.; YOHALEM, D. Detection, Quantification and Immunolocalisation of *Botrytis* species. In: ELAD, Y. et al. (Eds.). . **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 181–194.

DEWIR, Y. H. et al. In vitro rooting of leguminous plants: Difficulties, alternatives, and strategies for improvement. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 57, n. 4, p. 311–322, 1 ago. 2016.

DEWITTE-ORR, S. J. et al. Long Double-Stranded RNA Induces an Antiviral Response Independent of IFN Regulatory Factor 3, IFN- β Promoter Stimulator 1, and IFN. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6545–6553, 15 nov. 2009.

DOU, T. et al. Host-induced gene silencing of Foc TR4 ERG6/11 genes exhibits superior resistance to Fusarium wilt of banana. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, n. 1, p. 11–13, 2020.

DROBY, S.; LICHTER, A. Post-Harvest Botrytis Infection: Etiology, Development and Management. In: ELAD, Y. et al. (Eds.). . **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 349–367.

DUAN, Y.-B. et al. Development and Evaluation of a Novel and Rapid Detection Assay for Botrytis cinerea Based on Loop-Mediated Isothermal Amplification. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. e111094, 20 out. 2014.

EDWARDS, S. G.; SEDDON, B. Selective media for the specific isolation and enumeration of Botrytis cinerea conidia. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 63–66, fev. 2001.

ELAD, Y. Cultural and Integrated Control of Botrytis spp. In: FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Eds.). . **Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 149–164.

ELAD, Y. et al. Plant Hosts of Botrytis spp. In: FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Eds.). . **Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 413–486.

ELAD, Y.; BÉLANGER, R. R.; KOHL, J. Biological Control of Diseases in the Phyllosphere. In: ALBAJES, R. et al. (Eds.). . **Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops**. Developments in Plant Pathology. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999. p. 338–352.

ELAD, Y.; EVENSEN, K. Physiological Aspects of Resistance to Botrytis cinerea. **Phytopathology**, 1995.

ELAD, Y.; SHTIENBERG, D. Botrytis cinerea in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 1, n. 1, p. 15–29, mar. 1995.

ELAD, Y.; STEWART, A. Microbial Control of Botrytis spp. In: ELAD, Y. et al. (Eds.). **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 223–241.

EPI SISTEM. WINBIOTOOL - PROJECT DESCRIPTION & GOALS. Disponível em: <http://www.tehnoadvice.ro/winbiotool.html> Acesso em: 18 de maio de 2021

FAHRENTTRAPP, J. et al. Detection of Gray Mold Leaf Infections Prior to Visual Symptom Appearance Using a Five-Band Multispectral Sensor. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.

FAN, J. et al. circRNAs Are Involved in the Rice-Magnaporthe oryzae Interaction1[OPEN]. **Plant Physiology**, v. 182, n. 1, p. 272–286, jan. 2020.

FAN, X. et al. Development of PCR-Based Assays for Detecting and Differentiating Three Species of Botrytis Infecting Broad Bean. **Plant Disease**, v. 99, n. 5, p. 691–698, 16 dez. 2014.

FANALE, D. et al. Circular RNA in Exosomes. In: XIAO, J. (Ed.). . **Circular RNAs: Biogenesis and Functions**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer, 2018. p. 109–117.

FERNÁNDEZ-BALDO, M. A. et al. Screen-printed immunosensor modified with carbon nanotubes in a continuous-flow system for the Botrytis cinerea determination in apple tissues. **Talanta**, v. 79, n. 3, p. 681–686, 15 ago. 2009.

FERNÁNDEZ-BALDO, M. A. et al. Microfluidic immunosensor with micromagnetic beads coupled to carbon-based screen-printed electrodes (SPCEs) for determination of Botrytis cinerea in tissue of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 21, p. 11201–11206, 10 nov. 2010.

FERNÁNDEZ-BALDO, M. A. et al. Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay applied to the Botrytis cinerea quantification in tissues of postharvest fruits. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 220, 4 out. 2011.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D. et al. Independent Emergence of Resistance to Seven Chemical Classes of Fungicides in Botrytis cinerea. **Phytopathology®**, v. 105, n. 4, p. 424–432, 15 out. 2014.

FILLINGER, S.; ELAD, Y. (EDS.). **Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2016.

FILLINGER, S.; WALKER, A.-S. Chemical Control and Resistance Management of Botrytis Diseases. In: FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Eds.). . **Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 189–216.

FISCHER, J. W. et al. Structure-Mediated RNA Decay by UPF1 and G3BP1. **Molecular Cell**, v. 78, n. 1, p. 70- 84.e6, 2 abr. 2020.

FLETCHER, S. J. et al. A Perspective on RNAi-Based Biopesticides. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

FRAC. **FRAC Code List ©*2021: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups**

on product labels), mar. 2021. Disponível em: <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a_2>. Acesso em: 23 maio. 2021

FRÍAS, M.; GONZÁLEZ, C.; BRITO, N. BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. **New Phytologist**, v. 192, n. 2, p. 483–495, 2011.

GACHON, C.; SAINDRENAN, P. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 367–371, 1 maio 2004.

GAO, Y.; WANG, J.; ZHAO, F. CIRI: an efficient and unbiased algorithm for de novo circular RNA identification. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 4, 13 jan. 2015.

GARCÍA, J. M.; AGUILERA, C.; JIMÉNEZ, A. M. Gray Mold in and Quality of Strawberry Fruit following Postharvest Heat Treatment. **HortScience**, v. 31, n. 2, p. 255–257, 1 abr. 1996.

GARFINKEL, A. R. et al. *Botrytis euroamericana*, a new species from peony and grape in North America and Europe. **Mycologia**, v. 109, n. 3, p. 495–507, 4 maio 2017.

GÁSPÁR, S.; BRINDUSE, E.; VASILESCU, A. Electrochemical Evaluation of Laccase Activity in Must. **Chemosensors**, v. 8, n. 4, p. 126, dez. 2020.

GHORBANI, A. et al. Detection and profiling of circular RNAs in uninfected and maize Iranian mosaic virus-infected maize. **Plant Science**, v. 274, p. 402–409, 1 set. 2018.

GIJZEN, M.; NÜRNBERGER, T. Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. **Phytochemistry**, v. 67, n. 16, p. 1800–1807, ago. 2006.

GONZÁLEZ, C.; BRITO, N.; SHARON, A. Infection Process and Fungal Virulence Factors. In: FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Eds.). **Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 229–246.

GOVRIN, E. M. et al. An Elicitor from *Botrytis cinerea* Induces the Hypersensitive Response in *Arabidopsis thaliana* and Other Plants and Promotes the Gray Mold Disease. **Phytopathology**, v. 96, n. 3, p. 299–307, mar. 2006.

GOVRIN, E. M.; LEVINE, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. **Current Biology**, v. 10, n. 13, p. 751–757, 1 jun. 2000.

GU, K.-X. et al. A β 2-tubulin dsRNA derived from *Fusarium asiaticum* confers plant resistance to multiple phytopathogens and reduces fungicide resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 153, p. 36–46, 1 jan. 2019.

GUALTIERI, C.; LEONETTI, P.; MACOVEI, A. Plant miRNA Cross-Kingdom Transfer Targeting Parasitic and Mutualistic Organisms as a Tool to Advance Modern Agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, jun. 2020.

GUO, Y.; WEI, X.; PENG, Y. Structure-Mediated Degradation of CircRNAs. **Trends in Cell Biology**, v. 30, n. 7, p. 501–503, 1 jul. 2020.

HANSEN, T. B. et al. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 21, p. 4414–4422, 2 nov. 2011.

HANSEN, T. B. et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 384–388, mar. 2013.

HANSEN, T. B. et al. Comparison of circular RNA prediction tools. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 6, p. e58–e58, 7 abr. 2016.

HAUSBECK, M.; HARLAN, B. **Recommendations for Botrytis fungicides for 2020**. Disponível em: <<https://www.canr.msu.edu/news/recommendations-for-botrytis-fungicides>>. Acesso em: 23 maio. 2021.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1704–1712, 2003.

HÉBERT, C. et al. STRAWBERRY PROANTHOCYANIDINS: BIOCHEMICAL MARKERS FOR BOTRYTIS CINEREA RESISTANCE AND SHELF-LIFE PREDICTABILITY. **Acta Horticulturae**, n. 567, p. 659–662, jan. 2002.

HEWEZI, T. et al. The Arabidopsis MicroRNA396- GRF1/GRF3 Regulatory Module Acts as a Developmental Regulator in the Reprogramming of Root Cells during Cyst Nematode Infection. **Plant Physiology**, v. 159, n. 1, maio 2012.

HEWEZI, T. et al. Arabidopsis miR827 mediates post-transcriptional gene silencing of its ubiquitin E3 ligase target gene in the syncytium of the cyst nematode *Heterodera schachtii* to enhance susceptibility. **The Plant Journal**, v. 88, n. 2, out. 2016.

HILL, G. N. et al. Near and Mid-Infrared Spectroscopy for the Quantification of Botrytis Bunch Rot in White Wine Grapes. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 21, n. 6, p. 467–475, 1 dez. 2013.

HÖFLE, L. et al. Study on the efficiency of dsRNAs with increasing length in RNA-based silencing of the *Fusarium* CYP51 genes. **RNA Biology**, v. 17, n. 4, p. 463–473, 13 jan. 2020.

HOLZ, G.; COERTZE, S.; WILLIAMSON, B. The Ecology of Botrytis on Plant Surfaces. In: ELAD, Y. et al. (Eds.). . **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 9–27.

HSU, M.-T.; COCA-PRADOS, M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. **Nature**, v. 280, n. 5720, p. 339–340, jul. 1979.

HUA, L. et al. Pathogenic mechanisms and control strategies of Botrytis cinerea causing post-harvest decay in fruits and vegetables. **Food Quality and Safety**, v. 2, n. 3, p. 111–119, 27 ago. 2018.

HUNTER, W. B. et al. Advances in RNA interference: dsRNA Treatment in Trees and Grapevines for Insect Pest Suppression. **Southwestern Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 85–87, mar. 2012.

HYDE, K. D. et al. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 21–125, 1 jul. 2014.

IVANOV, A. et al. Analysis of Intron Sequences Reveals Hallmarks of Circular RNA Biogenesis in Animals. **Cell Reports**, v. 10, n. 2, p. 170–177, 13 jan. 2015.

JANISIEWICZ, W. J. et al. Dark Period Following UV-C Treatment Enhances Killing of Botrytis cinerea Conidia and Controls Gray Mold of Strawberries. **Phytopathology**, v. 106, n. 4, p. 386–394, abr. 2016.

JARVIS, W. R. The infection of strawberry and raspberry fruits by Botrytis cinerea Fr. **Annals of Applied Biology**, v. 50, n. 3, p. 569–575, 1962.

JENSEN, P. D. et al. Computational sequence analysis of predicted long dsRNA transcriptomes of major crops reveals sequence complementarity with human genes. **GM Crops & Food**, v. 4, n. 2, p. 90–97, 1 abr. 2013.

JERSCH, S. et al. Proanthocyanidins as basis for quiescence of Botrytis cinerea in immature strawberry fruits / Proanthocyanidine als Ursache der Quieszenz von Botrytis cinerea in unreifen Erdbeerfrüchten. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 96, n. 4, p. 365–378, 1989.

JIANG, J.-Y. et al. JEDI: Circular RNA Prediction based on Junction Encoders and Deep Interaction among Splice Sites. **bioRxiv**, p. 2020.02.03.932038, 10 fev. 2020.

JIN, P. et al. UV-C enhances resistance against gray mold decay caused by Botrytis cinerea in strawberry fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 106–111, 18 nov. 2017.

JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P.; BARTEL, B. MicroRNAs AND THEIR REGULATORY ROLES IN PLANTS. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, jun. 2006.

K, K.; I.U, R. MORPHOPHYSIOLOGICALS PROBLEMS IN ACCLIMATIZATION OF MICROPROPAGATED PLANTS IN -EX VITRO CONDITIONS- A REVIEWS. v. 2, n. 4, p. 271–283, 1 jan. 2012.

KAHRAMANOĞLU, İ. et al. Improving Storability of “Nanfeng” Mandarins by Treating with Postharvest Hot Water Dipping. **Journal of Food Quality**, v. 2020, p. e8524952, 27 fev. 2020.

KAPOOR, M. et al. Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 451, 1 out. 2008.

KARS, I. et al. Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, v. 43, n. 2, p. 213–225, jul. 2005.

KERSSIES, A. A selective medium for *Botrytis cinerea* to be used in a spore-trap. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 96, n. 4, p. 247–250, 1 jul. 1990.

KIM, K. S.; MIN, J.-Y.; DICKMAN, M. B. Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 21, n. 5, p. 605–612, maio 2008.

KNEE, M.; SARGENT, J. A.; OSBORNE, D. J. Cell Wall Metabolism in Developing Strawberry Fruits. **Journal of Experimental Botany**, v. 28, n. 103, p. 377–396, 1977.

KOCH, A. et al. Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 48, p. 19324–19329, 26 nov. 2013.

KOCH, A. et al. An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 10, p. e1005901, 13 out. 2016.

KOCH, A. et al. SIGS vs HIGS: a study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence *Fusarium* FgCYP51 genes in infected host and non-host plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 12, p. 1636–1644, dez. 2019.

KOS, A. et al. The hepatitis delta (δ) virus possesses a circular RNA. **Nature**, v. 323, n. 6088, p. 558–560, out. 1986.

KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, jan. 2019.

KRISTENSEN, L. S. et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 11, p. 675–691, nov. 2019.

LAI, X. et al. CircRNAs in Plants. In: XIAO, J. (Ed.). . **Circular RNAs: Biogenesis and Functions**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer, 2018. p. 329–343.

LAU, H. Y. et al. Field Demonstration of a Multiplexed Point-of-Care Diagnostic Platform for Plant Pathogens. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 16, p. 8074–8081, 16 ago. 2016.

LEE, H. et al. Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in Arabidopsis. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 9, maio 2010.

LEROUX, P. Chemical Control of Botrytis and its Resistance to Chemical Fungicides. In: ELAD, Y. et al. (Eds.). . **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 195–222.

LI, H. et al. Comparative Proteomics Reveals the Potential Targets of BcNoxR, a Putative Regulatory Subunit of NADPH Oxidase of Botrytis cinerea. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 29, n. 12, p. 990–1003, 29 nov. 2016.

LI, Q.-F. et al. Circular RNAs roll into the regulatory network of plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 488, n. 2, p. 382–386, 24 jun. 2017.

LI, S. et al. MicroRNAs Inhibit the Translation of Target mRNAs on the Endoplasmic Reticulum in Arabidopsis. **Cell**, v. 153, n. 3, abr. 2013.

LI, Y. et al. Multiple Rice MicroRNAs Are Involved in Immunity against the Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. **Plant Physiology**, v. 164, n. 2, p. 1077–1092, fev. 2014.

LIANG, Y. et al. Identification and characterization of known and novel microRNAs in strawberry fruits induced by Botrytis cinerea. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 10921, 19 jul. 2018.

LITHOLDO, C. G.; DA FONSECA, G. C. Circular RNAs and Plant Stress Responses. In: XIAO, J. (Ed.). . **Circular RNAs**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer Singapore, 2018. v. 1087p. 345–353.

LIU, C.-X. et al. Structure and Degradation of Circular RNAs Regulate PKR Activation in Innate Immunity. **Cell**, v. 177, n. 4, p. 865- 880.e21, 2 maio 2019.

LIU, Q. et al. Circular RNA Related to the Chondrocyte ECM Regulates MMP13 Expression by Functioning as a MiR-136 ‘Sponge’ in Human Cartilage Degradation. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 22572, 2 mar. 2016.

LU, M. Circular RNA: functions, applications and prospects. **ExRNA**, v. 2, n. 1, p. 1, 2 mar. 2020.

LU, T. et al. Transcriptome-wide investigation of circular RNAs in rice. **RNA**, v. 21, n. 12, p. 2076–2087, 12 jan. 2015.

LUPTOVČIAK, I. et al. KATANIN 1 Is Essential for Embryogenesis and Seed Formation in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, maio 2017.

MA, L. et al. Research advance in regulation of fruit quality characteristics by microRNAs. **Food Quality and Safety**, v. 4, n. 1, maio 2020.

MAB, M. et al. Suppression of Botrytis cinerea sporulation by Clonostachys rosea on rose debris: a valuable component in Botrytis blight management in commercial greenhouses. **Biological Control: Theory and Applications in Pest Management**, v. 26, n. 3, p. 311–317, 1 mar. 2003.

MALTA, B. M. **Epidemiologia e manejo do mofo cinzento no morango**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2017.

MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; GARCÍA, J. M.; POZO, M. J. Induced systemic resistance against Botrytis cinerea by Micromonospora strains isolated from root nodules. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.

MARUMO, S. et al. Microbial Production of Abscisic Acid by Botrytis cinerea. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 1967–1968, 1 jul. 1982.

MASCINI, M.; TOMBELLI, S. Biosensors for biomarkers in medical diagnostics. **Biomarkers**, v. 13, n. 7–8, p. 637–657, 1 jan. 2008.

MAUCH-MANI, B.; MAUCH, F. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 409–414, ago. 2005.

MCLOUGHLIN, A. G. et al. Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against Sclerotinia sclerotiorum and Botrytis cinerea. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 7320, 9 maio 2018.

MEHLI, L. et al. A case study from the interaction of strawberry and Botrytis cinerea highlights the benefits of comonitoring both partners at genomic and mRNA level. **New Phytologist**, v. 168, n. 2, p. 465–474, nov. 2005.

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications – A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p. 153–159, 1 maio 2016.

MELLERSH, D. G. et al. H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant–fungal interactions. **The Plant Journal**, v. 29, n. 3, p. 257–268, 2002.

MELNYK, C. W.; MOLNAR, A.; BAULCOMBE, D. C. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. **The EMBO journal**, v. 30, n. 17, p. 3553–3563, 31 ago. 2011.

MEMCZAK, S. et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 333–338, mar. 2013.

MENG, X. et al. CircFunBase: a database for functional circular RNAs. **Database**, v. 2019, n. baz003, 1 jan. 2019.

MERCIER, J.; ARUL, J.; JULIEN, C. Effect of UV-C on Phytoalexin Accumulation and Resistance to *Botrytis cinerea* in Stored Carrots. **Journal of Phytopathology**, v. 139, n. 1, p. 17–25, 1993.

MEYER, U. M.; SPOTTS, R. A.; DEWEY, F. M. Detection and Quantification of *Botrytis cinerea* by ELISA in Pear Stems During Cold Storage. **Plant Disease**, v. 84, n. 10, p. 1099–1103, 1 out. 2000.

MITTER, N. et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. **Nature Plants**, v. 3, p. 16207, 9 jan. 2017.

(MOLLY), F. M. D.; GRANT-DOWNTON, R. *Botrytis*-Biology, Detection and Quantification. In: FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Eds.). . **Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 17–34.

MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, L. A. **Manejo integrado do mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea***. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. 35p. il. 2005. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 44).

MOTOMURA, K. et al. The role of decapping proteins in the miRNA accumulation in *Arabidopsis thaliana*. **RNA Biology**, v. 9, n. 5, maio 2012.

NALLY, M. C. et al. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. **Postharvest Biology and Technology**, v. 64, n. 1, p. 40–48, 1 fev. 2012.

NEWMAN, J. D. et al. Biosensors: a clearer view. **Biosensors**, 2004.

NICOT, P. C. et al. Biological Control and Biopesticide Suppression of *Botrytis*-Incited Diseases. In: FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Eds.). . **Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 165–187.

NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; LIMA, G. Use of UV-C light to reduce *Botrytis* storage rot of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 13, n. 3, p. 171–181, 1 jun. 1998.

NIGRO, J. M. et al. Scrambled exons. **Cell**, v. 64, n. 3, p. 607–613, 8 fev. 1991.

NODA, J.; BRITO, N.; GONZÁLEZ, C. The *Botrytis cinerea* xylanase Xyn11A contributes to virulence with its necrotizing activity, not with its catalytic activity. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 38, 25 fev. 2010.

NOWARA, D. et al. HIGS: Host-Induced Gene Silencing in the Obligate Biotrophic Fungal Pathogen *Blumeria graminis*. **The Plant Cell**, v. 22, n. 9, p. 3130–3141, 1 set. 2010.

NUNES, C. C.; DEAN, R. A. Host-induced gene silencing: a tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 5, p. 519–529, jun. 2012.

OBANOR, F. O. et al. Optimisation of PTAELISA detection and quantification of *Botrytis cinerea* infections in grapes. **New Zealand Plant Protection**, v. 57, p. 130–137, 1 ago. 2004.

O'BRIEN, J. et al. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, ago. 2018.

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

PANWAR, V.; MCCALLUM, B.; BAKKEREN, G. Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the Barley stripe mosaic virus. **Plant Molecular Biology**, v. 81, n. 6, p. 595–608, 1 abr. 2013.

PARK, O. H. et al. Endoribonucleolytic Cleavage of m6A-Containing RNAs by RNase P/MRP Complex. **Molecular Cell**, v. 74, n. 3, p. 494–507.e8, 2 maio 2019.

PARK, Y. J. et al. MicroRNA400-Guided Cleavage of Pentatricopeptide Repeat Protein mRNAs Renders *Arabidopsis thaliana* More Susceptible to Pathogenic Bacteria and Fungi. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 9, p. 1660–1668, 1 set. 2014.

PETRASCH, S. et al. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 6, p. 877–892, 4 abr. 2019.

PRAKASH, V.; DEVENDRAN, R.; CHAKRABORTY, S. Overview of plant RNA dependent RNA polymerases in antiviral defense and gene silencing. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 4, p. 493–505, 1 dez. 2017.

PRUSKY, D.; LICHTER, A. Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. **FEMS Microbiology Letters**, v. 268, n. 1, p. 1–8, 1 mar. 2007.

QI, T. et al. Host-induced gene silencing of an important pathogenicity factor PsCPK1 in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* enhances resistance of wheat to stripe rust. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 3, p. 797–807, mar. 2018.

QI, T. et al. Host-Induced Gene Silencing: A Powerful Strategy to Control Diseases of Wheat and Barley. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, 8 jan. 2019a.

QI, T. et al. Stripe Rust Effector PstGSRE1 Disrupts Nuclear Localization of ROS-Promoting Transcription Factor TaLOL2 to Defeat ROS-Induced Defense in Wheat. **Molecular Plant**, v. 12, n. 12, p. 1624–1638, 2 dez. 2019b.

QIN, G. et al. Inhibitory effect of boron against *Botrytis cinerea* on table grapes and its possible mechanisms of action. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 1–2, p. 145–150, 31 mar. 2010.

QIN, X. et al. Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. **Postharvest Biology and Technology**, v. 100, p. 160–167, 1 fev. 2015.

RAMACHANDRAN, V.; CHEN, X. Degradation of microRNAs by a Family of Exoribonucleases in *Arabidopsis*. **Science**, v. 321, n. 5895, set. 2008.

RAY, M. et al. Fungal disease detection in plants: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 708–723, 15 jan. 2017.

REN, G. et al. Methylation protects microRNAs from an AGO1-associated activity that uridylyates 5' RNA fragments generated by AGO1 cleavage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 17, p. 6365–6370, 29 abr. 2014.

REN, Y. et al. Identification and characterization of circRNAs involved in the regulation of low nitrogen-promoted root growth in hexaploid wheat. **Biological Research**, v. 51, n. 1, p. 43, 3 nov. 2018.

RIES, S. M. **RPD No. 704 - Gray Mold of Strawberry**. Disponível em: <<http://ipm.illinois.edu/diseases/series700/rpd704/>>. Acesso em: 2 maio. 2021.

RIGOTTI, S. et al. Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, n. 2, p. 169–174, 1 abr. 2002.

ROLKE, Y. et al. Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 1, p. 17–27, 1 jan. 2004.

ROMANAZZI, G.; DROBY, S. Control Strategies for Postharvest Grey Mould on Fruit Crops. In: FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Eds.). . **Botrytis – the Fungus, the**

Pathogen and its Management in Agricultural Systems. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 217–228.

ROMANAZZI, G.; FELIZIANI, E. Chapter 4 - Botrytis cinerea (Gray Mold). In: BAUTISTA-BAÑOS, S. (Ed.). **Postharvest Decay**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 131–146.

ROSSI, F. R. et al. The Sesquiterpene Botrydial Produced by Botrytis cinerea Induces the Hypersensitive Response on Plant Tissues and Its Action Is Modulated by Salicylic Acid and Jasmonic Acid Signaling. **Molecular Plant-Microbe Interactions**[®], v. 24, n. 8, p. 888–896, 13 jul. 2011.

SABBIONE, A. et al. Genome-wide analysis of AGO, DCL and RDR gene families reveals RNA-directed DNA methylation is involved in fruit abscission in Citrus sinensis. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 401, 12 set. 2019.

CORDIS. Final Report Summary - SAFEGRAPE (Biosensor-based instrumentations to be used in vineyards and wineries for fast and sensitive detection of Botrytis cinerea, grey rot, in grapes). **CORDIS**, 5 de julho de 2013. Disponível em: < [Final Report Summary - SAFEGRAPE \(Biosensor-based instrumentations to be used in vineyards and wineries for fast and sensitive detection of Botrytis cinerea, grey rot, in grapes\) | Report Summary | SAFEGRAPE | FP7 | CORDIS | European Commission \(europa.eu\)](#)>. Acesso em: 18 de maio de 2021

SANG, H.; KIM, J.-I. Advanced strategies to control plant pathogenic fungi by host-induced gene silencing (HIGS) and spray-induced gene silencing (SIGS). **Plant Biotechnology Reports**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 1 fev. 2020.

SANGER, H. L. et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 11, p. 3852–3856, 1 nov. 1976.

SANZANI, S. M. et al. Early detection of Botrytis cinerea latent infections as a tool to improve postharvest quality of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 68, p. 64–71, 1 jun. 2012.

SCARBORO, C. G. et al. Quantification of gray mold infection in lettuce using a bispectral imaging system under laboratory conditions. **Plant Direct**, v. 5, n. 3, 24 mar. 2021.

SCHAEFER, L. K. et al. Cross-Kingdom RNAi of Pathogen Effectors Leads to Quantitative Adult Plant Resistance in Wheat. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

SCHAUER, S. E. et al. DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 11, nov. 2002.

SCHUMACHER, J. Signal Transduction Cascades Regulating Differentiation and Virulence in Botrytis cinerea. In: FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Eds.). . **Botrytis –**

the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 247–267.

SEGMÜLLER, N. et al. NADPH Oxidases Are Involved in Differentiation and Pathogenicity in *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 21, n. 6, p. 808–819, 8 maio 2008.

ŞESAN, T. E. et al. Antifungal activity of some plant extracts against *Botrytis cinerea* Pers. In the blackcurrant CROP (*Ribes nigrum* L.). **Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus**, v. 14, p. 29–43, 1 jan. 2015.

SHAO, J. et al. Identification and characterization of circular RNAs in *Ganoderma lucidum*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 16522, 11 nov. 2019.

SIEGMUND, U.; VIEFHUES, A. Reactive Oxygen Species in the *Botrytis* – Host Interaction. In: FILLINGER, S.; ELAD, Y. (Eds.). . **Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems.** Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 269–289.

SIVAKUMAR, D.; BAUTISTA-BAÑOS, S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. **Crop Protection**, v. 64, p. 27–37, 1 out. 2014.

SONG, J.-J. Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity. **Science**, v. 305, n. 5689, set. 2004.

SONG, X. et al. MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plant–Environment Interactions. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, n. 1, abr. 2019.

SONG, X.-S. et al. A myosin5 dsRNA that reduces the fungicide resistance and pathogenicity of *Fusarium asiaticum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 150, p. 1–9, 1 set. 2018.

SONG, Y.; THOMMA, B. P. H. J. Host-induced gene silencing compromises *Verticillium* wilt in tomato and *Arabidopsis*. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 1, p. 77–89, jan. 2018.

STAATS, M.; VAN BAARLEN, P.; VAN KAN, J. A. L. Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 2, p. 333–346, 1 fev. 2005.

STEPIEN, A. et al. Posttranscriptional coordination of splicing and miRNA biogenesis in plants. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 8, n. 3, maio 2017.

SUAREZ, M. B. et al. Development of real-time PCR (TaqMan®) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 890–899, set. 2005.

SUN, X. et al. Integrative analysis of Arabidopsis thaliana transcriptomics reveals intuitive splicing mechanism for circular RNA. **FEBS Letters**, v. 590, n. 20, p. 3510–3516, 2016.

SZABO, L. et al. Statistically based splicing detection reveals neural enrichment and tissue-specific induction of circular RNA during human fetal development. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 126, 16 jun. 2015.

TANI, H. et al. Botcinins A, B, C, and D, metabolites produced by Botrytis cinerea, and their antifungal activity against Magnaporthe grisea, a pathogen of rice blast disease. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1768–1772, dez. 2005.

TAYLOR, P. W. J.; FORD, R. Diagnostics, genetic diversity and pathogenic variation of ascochyta blight of cool season food and feed legumes. In: TIVOLI, B. et al. (Eds.). . **Ascochyta blights of grain legumes**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 127–133.

TEN HAVE, A. et al. The endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required for full virulence of Botrytis cinerea. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 11, n. 10, p. 1009–1016, out. 1998.

TERRY, L. A. et al. Preformed antifungal compounds in strawberry fruit and flower tissues. **Postharvest Biology and Technology**, v. 31, n. 2, p. 201–212, 1 fev. 2004.

THOMIDIS, T. et al. Biological control of fruit rots on strawberry and grape by BOTRY-Zen. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 43, n. 1, p. 68–72, 2 jan. 2015.

TIAN, S.; QIN, G.; LI, B. Reactive oxygen species involved in regulating fruit senescence and fungal pathogenicity. **Plant Molecular Biology**, v. 82, n. 6, p. 593–602, 1 ago. 2013.

TÖFOLI, J. G. et al. BOTRYTIS SP. EM ESPÉCIES HORTÍCOLAS: HOSPEDEIROS, SINTOMAS E MANEJO. **Biológico**, v. 73, n. 1, p. 10, 2011.

TOMLINSON, J. A.; DICKINSON, M. J.; BOONHAM, N. Detection of Botrytis cinerea by loop-mediated isothermal amplification. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 650–657, 2010.

TONG, W. et al. Circular RNA architecture and differentiation during leaf bud to young leaf development in tea (Camellia sinensis). **Planta**, v. 248, n. 6, p. 1417–1429, dez. 2018.

TOURÉ, Y. et al. Role of lipopeptides produced by Bacillus subtilis GA1 in the reduction of grey mould disease caused by Botrytis cinerea on apple. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 5, p. 1151–1160, 2004.

TU, B. et al. Distinct and Cooperative Activities of HESO1 and URT1 Nucleotidyl Transferases in MicroRNA Turnover in Arabidopsis. **PLOS Genetics**, v. 11, n. 4, abr. 2015.

VALERO-JIMÉNEZ, C. A. et al. Comparative genomics of plant pathogenic Botrytis species with distinct host specificity. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 203, 12 mar. 2019.

VAN BAARLEN, P.; LEGENDRE, L.; VAN KAN, J. A. L. Plant Defence Compounds Against Botrytis Infection. In: ELAD, Y. et al. (Eds.). **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 143–161.

VÀSQUEZ, H. et al. Hormetic doses of UV-C light decrease the susceptibility of tomato plants to Botrytis cinerea infection. **Journal of Phytopathology**, v. 168, n. 9, p. 524–532, 2020.

VEGA, K. et al. UV-C radiation for control of gray mold disease in postharvest cut roses. **Journal of Plant Protection Research**, v. 60, n. 4, p. 351–361, 22 out. 2020.

VELOSO, J.; KAN, J. A. L. VAN. Many Shades of Grey in Botrytis–Host Plant Interactions. **Trends in Plant Science**, v. 23, n. 7, p. 613–622, 1 jul. 2018.

VERHAGEN, B. W. M. et al. Pseudomonas spp.-induced systemic resistance to Botrytis cinerea is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 1, p. 249–260, 1 jan. 2010.

VERHOEFF, K. et al. Changes in pH and the Production of Organic Acids During Colonization of Tomato Petioles by Botrytis cinerea. **Journal of Phytopathology**, v. 122, n. 4, p. 327–336, 1988.

VIDAL, E. A. et al. Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in Arabidopsis thaliana. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 9, mar. 2010.

VILAPLANA, R. et al. Combination of hot water treatment and chitosan coating to control anthracnose in papaya (Carica papaya L.) during the postharvest period. **Crop Protection**, v. 128, p. 105007, 1 fev. 2020.

WAINWRIGHT, H. Overcoming problems in establishing micropropagules—guidelines for growers. **Professional Horticulture**, v. 2, n. 3, p. 67–72, 1988.

WANG, H. et al. The interplay between microRNA and alternative splicing of linear and circular RNAs in eleven plant species. **Bioinformatics**, v. 35, n. 17, p. 3119–3126, 1 set. 2019a.

WANG, H.; WANG, H. The miR156/SPL Module, a Regulatory Hub and Versatile Toolbox, Gears up Crops for Enhanced Agronomic Traits. **Molecular Plant**, v. 8, n. 5, maio 2015.

- WANG, J. et al. Re-analysis of long non-coding RNAs and prediction of circRNAs reveal their novel roles in susceptible tomato following TYLCV infection. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 104, 4 jun. 2018a.
- WANG, J.; MEI, J.; REN, G. Plant microRNAs: Biogenesis, Homeostasis, and Degradation. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, mar. 2019.
- WANG, K. et al. MapSplice: Accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 18, p. e178–e178, 1 out. 2010.
- WANG, K. et al. CropCircDB: a comprehensive circular RNA resource for crops in response to abiotic stress. **Database**, v. 2019, n. baz053, 1 jan. 2019b.
- WANG, M. et al. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. **Nature Plants**, v. 2, n. 10, set. 2016.
- WANG, P. L. et al. Circular RNA Is Expressed across the Eukaryotic Tree of Life. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, p. e90859, 7 mar. 2014.
- WANG, T.-S.; ZHOU, J.-Y.; TAN, H. Three new metabolites from *Botrytis cinerea*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 10, n. 9–10, p. 919–924, out. 2008.
- WANG, X. et al. Degradation of unmethylated miRNA/miRNA*s by a DEDDy-type 3' to 5' exoribonuclease Atrimmer 2 in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 28, jul. 2018b.
- WANG, Y. et al. Identification of Circular RNAs and Their Targets in Leaves of *Triticum aestivum* L. under Dehydration Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2017a.
- WANG, Z. et al. Identification of Circular RNAs in Kiwifruit and Their Species-Specific Response to Bacterial Canker Pathogen Invasion. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017b.
- WANG, Z. et al. Osa-miR164a targets *OsNAC60* and negatively regulates rice immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **The Plant Journal**, v. 95, n. 4, p. 584–597, ago. 2018c.
- WEDGE, D. E. et al. Fungicide Resistance Profiles for 13 *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry in Southeastern Louisiana. **International Journal of Fruit Science**, v. 13, n. 4, p. 413–429, 2 out. 2013.
- WEE, E. J. H. et al. Re-purposing bridging flocculation for on-site, rapid, qualitative DNA detection in resource-poor settings. **Chemical Communications**, v. 51, n. 27, p. 5828–5831, 19 mar. 2015.

WEIBERG, A. et al. Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. **Science**, v. 342, n. 6154, p. 118–123, 4 out. 2013.

WESTHOLM, J. O. et al. Genome-wide analysis of drosophila circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation. **Cell Reports**, v. 9, n. 5, p. 1966–1980, 11 dez. 2014.

WHITE, J. G. et al. Mycostop - a novel biofungicide based on *Streptomyces griseoviridis*. **Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases - 1990. Vol. 1.**, p. 221–226, 1990.

WHITEHEAD, K. A. et al. Silencing or Stimulation? siRNA Delivery and the Immune System. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, n. 1, p. 77–96, 2011.

WILLIAMSON, B. et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 561–580, set. 2007.

WONG, J. et al. Roles of small RNAs in soybean defense against *Phytophthora sojae* infection. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, v. 79, n. 6, p. 928–940, set. 2014.

WU, D. et al. Early Detection of *Botrytis cinerea* on Eggplant Leaves Based on Visible and Near-Infrared Spectroscopy. **Transactions of the ASABE (American Society of Agricultural and Biological Engineers)**, v. 51, p. 1133–1139, 1 maio 2008.

XIANG, L. et al. Identification of circularRNAs and their targets in *Gossypium* under *Verticillium* wilt stress based on RNA-seq. **PeerJ**, v. 6, 16 mar. 2018.

XIE, Y. et al. Phytochrome-interacting factors directly suppress MIR156 expression to enhance shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis*. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, dez. 2017.

XIN, M. et al. Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 123, 24 jun. 2010.

XU, J.; CHUA, N.-H. Processing bodies and plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 1, fev. 2011.

XU, W.; MENG, Y.; WISE, R. P. *Mla*- and *Rom1* -mediated control of microRNA398 and chloroplast copper/zinc superoxide dismutase regulates cell death in response to the barley powdery mildew fungus. **New Phytologist**, v. 201, n. 4, mar. 2014.

XU, Y. et al. Identification and characterization of CircRNAs involved in the regulation of wheat root length. **Biological Research**, v. 52, n. 1, p. 19, 4 abr. 2019.

XU, Y.; LIANG, Y.; YANG, M. Effects of Composite LED Light on Root Growth and Antioxidant Capacity of *Cunninghamia lanceolata* Tissue Culture Seedlings. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9766, 5 jul. 2019.

YANG, L.; WU, G.; POETHIG, R. S. Mutations in the GW-repeat protein SUO reveal a developmental function for microRNA-mediated translational repression in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 1, jan. 2012.

YANG, X. et al. Cytoplasmic HYL1 modulates miRNA-mediated translational repression. **The Plant Cell**, n. koab090, 25 mar. 2021.

YE, C.-Y. et al. Widespread noncoding circular RNAs in plants. **New Phytologist**, v. 208, n. 1, p. 88–95, 2015.

YE, J. et al. AtCircDB: a tissue-specific database for *Arabidopsis* circular RNAs. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 58–65, 18 jan. 2019.

YIN, S. et al. PCirc: random forest-based plant circRNA identification software. **BMC Bioinformatics**, v. 22, n. 1, p. 10, 6 jan. 2021.

YIN, Z. et al. Genome-Wide Profiling of miRNAs and Other Small Non-Coding RNAs in the *Verticillium dahliae*-Inoculated Cotton Roots. **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35765, 25 abr. 2012.

YOON, J.-S.; KIM, K.; PALLI, S. R. Double-stranded RNA in exosomes: Potential systemic RNA interference pathway in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 23, n. 4, p. 1160–1164, 1 dez. 2020.

YU, Y.; JIA, T.; CHEN, X. The ‘how’ and ‘where’ of plant microRNAs. **New Phytologist**, v. 216, n. 4, 2017.

YU, Y.; MO, X.; MO, B. Chapter 1 - Introduction to plant small RNAs. In: GULERIA, P.; KUMAR, V. (Eds.). . **Plant Small RNA**. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 3–35.

YUAN, Y.-R. et al. Crystal Structure of *A. aeolicus* Argonaute, a Site-Specific DNA-Guided Endoribonuclease, Provides Insights into RISC-Mediated mRNA Cleavage. **Molecular Cell**, v. 19, n. 3, ago. 2005.

ZAHA, A.; FERREIRA, HE. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Basica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ZENG, X. et al. A comprehensive overview and evaluation of circular RNA detection tools. **PLOS Computational Biology**, v. 13, n. 6, p. e1005420, 8 jun. 2017.

ZHANG, B. et al. Linking key steps of microRNA biogenesis by TREX-2 and the nuclear pore complex in Arabidopsis. **Nature Plants**, v. 6, n. 8, p. 957–969, ago. 2020a.

ZHANG, H. et al. Functional Characterization of Calcineurin Homologs PsCNA1/PsCNB1 in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Using a Host-Induced RNAi System. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49262, 6 nov. 2012.

ZHANG, J. et al. GreenCircRNA: a database for plant circRNAs that act as miRNA decoys. **Database**, v. 2020, n. baaa039, 1 jan. 2020b.

ZHANG, P. et al. PlantCircNet: a database for plant circRNA–miRNA–mRNA regulatory networks. **Database**, v. 2017, n. bax089, 1 jan. 2017a.

ZHANG, P. et al. A large-scale circular RNA profiling reveals universal molecular mechanisms responsive to drought stress in maize and Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 98, n. 4, p. 697–713, 2019.

ZHANG, P. et al. CircPlant: An Integrated Tool for circRNA Detection and Functional Prediction in Plants. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 18, n. 3, p. 352–358, 1 jun. 2020c.

ZHANG, P.; LI, S.; CHEN, M. Characterization and Function of Circular RNAs in Plants. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, 2020.

ZHANG, T. et al. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. **Nature Plants**, v. 2, n. 10, p. 16153, out. 2016a.

ZHANG, X. et al. Post-transcriptional gene silencing in plants: a double-edged sword. **Science China Life Sciences**, v. 59, n. 3, mar. 2016b.

ZHANG, X.-O. et al. Complementary Sequence-Mediated Exon Circularization. **Cell**, v. 159, n. 1, p. 134–147, 25 set. 2014.

ZHANG, Z. et al. RISC-interacting clearing 3'- 5' exoribonucleases (RICEs) degrade uridylated cleavage fragments to maintain functional RISC in *Arabidopsis thaliana*. **eLife**, v. 6, p. e24466, 2 maio 2017b.

ZHAO, T. et al. Characterization of conserved circular RNA in polyploid *Gossypium* species and their ancestors. **FEBS Letters**, v. 591, n. 21, p. 3660–3669, 2017a.

ZHAO, W. et al. Characterization of circRNAs associated with resistance to defoliating insects in soybean. **Oil Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 23–37, 2017b.

ZHAO, W. et al. Genome-wide identification and characterization of circular RNAs by high throughput sequencing in soybean. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5636, 17 jul. 2017c.

ZHAO, W.; CHU, S.; JIAO, Y. Present Scenario of Circular RNAs (circRNAs) in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.

ZHOU, R. et al. Transcriptome-Wide Identification and Characterization of Potato Circular RNAs in Response to *Pectobacterium carotovorum* Subspecies *brasiliense* Infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 27 dez. 2017.

ZHOU, Y. et al. Spatiotemporal Sequestration of miR165/166 by Arabidopsis Argonaute10 Promotes Shoot Apical Meristem Maintenance. **Cell Reports**, v. 10, n. 11, mar. 2015.

ZHU, H. et al. Arabidopsis Argonaute10 Specifically Sequesters miR166/165 to Regulate Shoot Apical Meristem Development. **Cell**, v. 145, n. 2, abr. 2011.

ZHU, L. et al. Host-Induced Gene Silencing of Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae* Pathogenicity Genes Mediated by the Brome Mosaic Virus. **Genes**, v. 8, n. 10, 26 set. 2017.

ZHU, Y.-X. et al. Identification of cucumber circular RNAs responsive to salt stress. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 164, 27 abr. 2019.

ZIMAND, G. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* Pathogenicity. **Phytopathology**, v. 86, n. 11, p. 1255, 1996.

ZOTTI, M. et al. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, p. 1239–1250, 2018.

ZUO, J. et al. Deciphering the roles of circRNAs on chilling injury in tomato. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 479, n. 2, p. 132–138, 14 out. 2016.