



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Efeito de mutações sítio-dirigidas no supressor viral de silenciamento gênico
do pepper ringspot virus**

MÁRCIO PEREIRA DE BARROS JÚNIOR

ORIENTADOR

Dr. Tatsuya Nagata

Dissertação de Mestrado

Brasília-DF, 2026



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Efeito das mutações sítio-dirigidas no supressor viral de silenciamento
gênico do pepper ringspot virus**

Márcio Pereira de Barros Júnior

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília-DF, 2026

MÁRCIO PEREIRA DE BARROS JÚNIOR

**Efeito das mutações sítio-dirigidas no supressor viral de silenciamento
gênico do pepper ringspot virus**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tatsuya Nagata
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)
(Presidente da banca e Orientador)

Dra. Marília Santos Silva Patriota
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Membro titular externo)

Dra. Eliane Ferreira Noronha
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)
(Membro titular interno da UnB)

Dr. Bergmann Morais Ribeiro
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)
(Membro suplente)

DEDICATÓRIA

À Dra. Ariane Bocaletto Frare e ao Dr. Rodrigo da Rocha Fragoso.

Com devoção filial e científica, dedico.

“Oh, voi misteriose galassie ..., io vi vedo, vi calcolo, vi intendo, vi studio e vi scopro, vi penetro e vi raccolgo. Da voi io prendo la luce e ne faccio scienza, prendo il moto e ne fo sapienza, prendo lo sfavillio dei colori e ne fo poesia; io prendo voi stelle nelle mie mani, e tremando nell’unità dell’essere mio vi alzo al di sopra di voi stesse, e in preghiera vi porgo al Creatore, che solo per mezzo mio voi stelle potete adorare”

(“Oh, vós misteriosas galáxias... eu vejo-vos, calculo-vos, entendo-vos, estudo-vos e descubro-vos, penetro-vos e reúno-vos. De vós tomo a luz e dela faço ciência, tomo o movimento e faço dele sabedoria, tomo o brilho das cores e dele faço poesia; tomo-vos, a vós estrelas, nas minhas mãos e, tremendo na unidade do meu ser, elevo-vos acima de vós mesmas, e em oração apresento-vos ao Criador, que somente através de mim vós estrelas podeis adorar”).

– Venerável Enrico Medi, astrofísico. “Le opere, Inno alla creazione” *apud* Papa Bento XVI. Audiência Geral, p. 03. Praça de São Pedro, Vaticano. 24 de março de 2010.

AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus, autor supremo da vida, cuja manifestação de amor em minha existência é a fonte de minha prática científica;

Ao estimado leitor e cientista: espero que este trabalho seja uma fonte de inspiração em sua prática científica e que esclareça dúvidas que a biologia molecular e a virologia tanto instigam. Que a sinceridade na busca pela verdade esteja em seu coração ao lê-lo;

Aos meus pais, Clarice Alves Rodrigues e Márcio Pereira de Barros, por serem meus eternos amores;

Aos meus irmãos, Macksuel Rodrigues de Barros, Mayara Rodrigues de Barros, Márcia Samara Rodrigues de Barros, Naylan Leopoldino de Barros e Luan Henrique Alves Rodrigues, por todo apoio e fraternidade;

Aos meus sobrinhos, Agatha Lorrany Rodrigues da Silva, Lara Gabriely Rodrigues Moreira, Levi Rodrigues Oliveira de Barros, Lucas Gabriel Alves Rodrigues e à pequenina Maitê Rodrigues da Silva, por todo o amor, pelos sorrisos banguelos e recepções calorosas;

À minha tia Cleonice Alves Rodrigues e à minha prima Amanda Vasconcelos Albuquerque, por terem sido as primeiras a acreditar em meu potencial e por todo o apoio moral oferecido;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Tatsuya Nagata, por me receber como orientando de modo tão cordial; pelas correções às minhas pronúncias horríveis em inglês; por toda a partilha de conhecimento de forma leve e descontraída; por todos os bons animes indicados, cafés e momentos compartilhados. O senhor possui o mais profundo e incondicional respeito de minha parte, pela humildade e sabedoria que carrega consigo. Continue assim para sempre!

Aos membros da banca, Dr. Bergmann Morais Ribeiro, Dra. Eliane Ferreira Noronha e Dra. Marília Santos Silva Patriota, obrigado por aceitarem de forma tão solícita participar desta etapa tão importante que constitui a defesa da presente dissertação;

À Bianca de Sousa Alcântara, Eduarda Flores Nogueira, Jaqueline dos Santos Mendes, José Henrique Francisco da Silva Bispo, Mariana Lopes Ventura, Renan Cunha de Souza e Sávio Bispo Reis, obrigado por me encorajarem! Vocês foram essenciais para o início, a permanência e a conclusão desta jornada;

Aos meus colegas de laboratório, Bruno Arcanjo Silva, Guilherme Belchior Lima da Fonseca, Julia Baratela Neto, Lucas Oliveira Mesquita e Saulo Sousa Alves, obrigado por essa jornada que trilhamos juntos;

À Caterynne Melo Kauffmann, Pedro Ricardo Vieira Hamann e à Priscila Rayane de Menezes Silva Machado, pelo acolhimento, respeito e orientações. Saibam que vocês contribuíram para minha vida de forma ímpar, e serei eternamente grato. Vocês são minhas referências;

À equipe do melhoramento de cafés da Embrapa Cerrados (CPAC), Dr. Adriano Delly Veiga, Dra. Natália Bortoleto Athayde e Dra. Solange da Rocha Monteiro de Andrade, pelo ensino, pesquisa, oportunidades e compreensão. Muito obrigado!

A Márcio Pereira de Barros Júnior, por todas as vezes em que se pôs à prova e se superou, sem desesperança, encorajando-se para permanecer firme nessa luta por um sonho. Parabéns! O Márcio Júnior do passado se orgulha de quem você se tornou e do sonho que realiza hoje!

À Universidade de Brasília (UnB – Câmpus Darcy Ribeiro), pela oportunidade de cursar o Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular).

À FAPDF, pelo apoio financeiro.

A todos, muitíssimo obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Família <i>Virgaviridae</i>	15
2.2. Pepper ringspot virus	15
2.3. Produção de clones infecciosos baseados em <i>Tobravirus</i>	20
2.4. PepRSV como vetor viral	20
2.5. Proteção cruzada e interferência mediada por RNA (RNAi)	26
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVO	29
5. METAS	29
6. MATERIAL E MÉTODOS	30
6.1. Isolados virais e manutenção	30
6.2. Inserção de mutações sítio-dirigidas em clone infeccioso de PepRSV	30
6.3. Transformação, seleção e confirmação da clonagem	31
6.4. Predição da estrutura tridimensional da proteína traduzida pelo gene VSR	32
6.5. Agroinfiltração de clone infeccioso de PepRSV em plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	32
6.6. Confirmação da infecção e quantificação da carga viral por RT-qPCR	32
7. RESULTADOS	34
7.1. Predição das estruturas tridimensionais das variantes atenuadas do VSR de PepRSV	34
7.2. Sintomas do estabelecimento de infecção do pepper ringspot virus para expressão do silenciamento gênico do <i>phytoene desaturase</i> em <i>N. benthamiana</i>	37
7.3. Sintomas do estabelecimento de infecção e atenuação dos clones 2 e 4 de pepper ringspot virus em <i>N. benthamiana</i> para proteção cruzada	39
7.4. Análise da curva-padrão e da curva de dissociação das construções de RNA1 co-infiltradas com o RNA2 do clone 2 (isolado Ag1) por RT-qPCR one step	43
8. DISCUSSÃO	49
9. CONCLUSÃO	54
10. PERSPECTIVAS FUTURAS	55
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
APÊNDICE A	65

RESUMO

Pepper pingspot virus (PepRSV) ou *Tobravirus capsici*, se trata de um vírus da família *Vigaviridae*, gênero *Tobravirus*, cujo genoma é bissegmentado, composto pelo RNA1 e RNA2, encapsulados individualmente. Ambos os segmentos são ssRNA+, apresentando uma estrutura *CAP* na extremidade 5' e uma estrutura "tRNA-like" na região 3'. No Brasil, o PepRSV foi relatado infectando pimenta (*Capsicum annuum*), tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), batata (*Solanum tuberosum*) e solano-violeta (*Solanum. violaefolium*), e recentemente foi descrito causando danos em batata (*Solanum tuberosum*) na África do Sul. Entre os genes envolvidos no processo de infecção do PepRSV destaca-se o supressor viral de silenciamento gênico (*Viral Suppressor of RNA silencing* = VSR) p16, localizado no RNA1. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto de deleções sítio-dirigidas no VSR sobre a virulência e o silenciamento gênico induzido por RNAi, visando gerar variantes atenuadas. Foram realizadas deleções sítio-dirigidas de dois códons de cisteína (TGC/TGT) presentes em diferentes regiões do RNA1 do isolado CAM2, resultando em três diferentes construções: construção 1 ($\Delta 6306-6308nt$ e $\Delta 6321-6323nt$); 2 ($\Delta 6375-6377nt$ e $\Delta 6378-6380nt$) e 3 (com as quatro deleções de códons de cisteínas combinadas). Uma quarta construção, denominada Δ VSR, foi obtida a partir da remoção completa do gene p16. Os mutantes de clones infecciosos foram construídos por meio da montagem de Gibson-Assembly. As modificações foram confirmadas por Sanger. Para os ensaios biológicos, as construções de RNA1 e RNA2 foram infiltradas via *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101::pM90 em 20 plantas de *Nicotiana benthamiana* para cada ensaio. As construções de RNA2 foram: (i) clone 2 (selvagem); (ii) RNA2-LAV-PDS, contendo 500 pb do gene *phytoene desaturase* (PDS); e (iii) clone 4, que induz necrose devido a uma inserção de citidina na capa proteica (CP). Os resultados indicaram que as construções com o gene p16 deletado (Δ VSR) ou com cisteínas deletadas no RNA1 (construções 1-3), combinados com RNA2 dos clones 2 ou 4, demonstraram atenuação dos sintomas do isolado Ag1 pelas deleções no VSR. A carga viral das construções derivadas de RNA1 de CAM2 foi mensurada via RT-qPCR. Os dados da quantificação absoluta por RT-qPCR foram submetidos à análise de variância (ANOVA), que revelou diferenças significativas entre os tratamentos em todos os tempos analisados (7, 14 e 21 dpi), com valores de $p < 0,001$ em todos os pontos experimentais para ambos os segmentos de RNA (RNA1 e RNA2). O isolado tipo selvagem apresentou níveis de acúmulo viral superior às demais construções para ambos os segmentos de RNA. As construções 1-3 exibiram níveis intermediários de acúmulo viral ao longo do tempo, sugerindo que tais deleções no VSR comprometem parcialmente a função do VSR. Por outro lado, a construção com o gene completamente deletado, Δ VSR, apresentou níveis reduzidos e decrescentes de cópias virais, indicando forte prejuízo na capacidade de manutenção da infecção. O isolado selvagem apresentou altíssima replicação inicial, de $\sim 6,46 \times 10^7$ cópias de RNA1 e $\sim 4,56 \times 10^6$ cópias de RNA2 aos 7 dpi. A Construção 1 apresentou um crescimento contínuo e replicação moderada, com ápice de $\sim 3,1 \times 10^6$ cópias aos 21 dpi. Nesse mesmo período, seu RNA2 teve um declínio no número de cópias, caindo de $\sim 1,60 \times 10^5$ cópias aos 7 dpi para $\sim 1,10 \times 10^5$ cópias aos 21 dpi. A Construção 2 apresentou a maior carga viral para RNA1 com um número de cópias de $\sim 4,9 \times 10^6$ aos 21 dpi, enquanto seu RNA2 chegou aos 21 dpi com aproximadamente $1,62 \times 10^5$ cópias. Por sua vez, a Construção 3 apresentou um perfil intermediário, mesmo possuindo o maior número de deleções de cisteínas entre as três construções, com ápice de $\sim 2,3 \times 10^6$ cópias de RNA1 e $\sim 5,68 \times 10^5$ cópias de RNA2 aos 21 dpi. A construção com o p16 deletado (Δ VSR), apresentou uma baixa carga viral para ambos os segmentos de RNA, com $\sim 4,0 \times 10^5$ cópias de RNA1 e $\sim 1,60 \times 10^5$ cópias de RNA2 aos 21 dpi. O tratamento com planta sadia, obteve valores entre 16 e 700 cópias em todos os tempos para RNA1 e RNA2, indicando um ruído basal. Os resultados também sugerem que, quando as construções do RNA1 (com deleções incorporadas ao seu genoma) são agroinfiltradas conjuntamente com o RNA2-LAV-PDS, há a indução de baixos níveis de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) e replicação viral para RNA2-LAV-PDS. Além disso, os dados obtidos são altamente relevantes para o desenvolvimento de vetores virais de expressão heteróloga. A eficiência desses sistemas depende de um equilíbrio entre replicação viral e viabilidade do hospedeiro. Enquanto o selvagem apresenta alta capacidade replicativa, sua elevada virulência limita sua aplicabilidade. Em contraste, as Construções 1-3, que apresentam o VSR parcialmente funcional, exibem um perfil mais adequado, permitindo infecção sustentada com menor impacto fisiológico, o que favorece a expressão estável de proteínas recombinantes. Por fim, a atenuação dos sintomas do clone 2 e clone 4 (mutante), indicam que a integridade estrutural do VSR é essencial para sua virulência.

Palavras-chave: PepRSV; *Nicotiana benthamiana*; Cisteínas; VSR; Atenuação.

ABSTRACT

Pepper pingspot virus (PepRSV) or *Tobravirus capsici* is a virus belonging to the family *Vigaviridae*, genus *Tobravirus*, with a bipartite genome composed of RNA1 and RNA2, which are individually encapsidated. Both segments are positive-sense single-stranded RNA (ssRNA⁺), featuring a 5' cap structure and a tRNA-like structure at the 3' terminus. In Brazil, PepRSV has been reported infecting pepper (*Capsicum annuum*), tomato (*Solanum lycopersicum* L.), potato (*Solanum tuberosum*), and *Solanum violaefolium*, and has recently been described causing damage in potato crops in South Africa. Among the genes involved in the PepRSV infection process, the viral suppressor of RNA silencing (VSR), p16, located on RNA1, is noteworthy. The objective of this study was to evaluate the impact of site-directed deletions in the VSR on virulence and RNA interference (RNAi)-mediated gene silencing, aiming to generate attenuated variants. Site-directed deletions were introduced targeting two cysteine codons (TGC/TGT) located in different regions of RNA1 from the CAM2 isolate, resulting in three distinct constructs: construct 1 (Δ 6306–6308 nt and Δ 6321–6323 nt); construct 2 (Δ 6375–6377 nt and Δ 6378–6380 nt); and construct 3 (harboring all four cysteine codon deletions combined). A fourth construct, designated Δ VSR, was generated by complete removal of the p16 gene. Infectious clone mutants were assembled using Gibson Assembly, and all modifications were confirmed by Sanger sequencing. For biological assays, RNA1 and RNA2 constructs were co-infiltrated via *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101::pM90 into 20 *Nicotiana benthamiana* plants per treatment. RNA2 constructs included: (i) clone 2 (wild-type); (ii) LAV-PDS, containing a 500 bp fragment of the phytoene desaturase (PDS) gene; and (iii) clone 4, which induces necrosis due to a cytidine insertion in the coat protein (CP) gene. The results showed that constructs harboring either the deleted p16 gene (Δ VSR) or cysteine deletions in RNA1 (constructs 1–3), when combined with RNA2 from clones 2 or 4, exhibited attenuation of symptoms of the Ag1 isolate due to VSR disruption. Viral load of RNA1-derived constructs from CAM2 was quantified by RT-qPCR. Absolute quantification data were subjected to analysis of variance (ANOVA), revealing significant differences among treatments at all evaluated time points (7, 14, and 21 dpi), with p-values < 0.001 for both RNA segments (RNA1 and RNA2). The wild-type isolate displayed higher viral accumulation levels than all other constructs for both RNA segments. Constructs 1–3 showed intermediate viral accumulation over time, suggesting that these VSR deletions partially impair VSR function. In contrast, the Δ VSR construct exhibited reduced and progressively decreasing viral copy numbers, indicating a strong impairment in infection maintenance capacity. The wild-type isolate showed very high initial replication levels, reaching approximately $\sim 6.46 \times 10^7$ RNA1 copies and $\sim 4.56 \times 10^6$ RNA2 copies at 7 dpi. Construct 1 exhibited continuous growth and moderate replication, peaking at $\sim 3.1 \times 10^6$ RNA1 copies at 21 dpi. Over the same period, its RNA2 copy number declined from $\sim 1.60 \times 10^5$ copies at 7 dpi to $\sim 1.10 \times 10^5$ copies at 21 dpi. Construct 2 showed the highest RNA1 viral load among mutants, reaching $\sim 4.9 \times 10^6$ copies at 21 dpi, while its RNA2 reached approximately $\sim 1.62 \times 10^5$ copies at the same time point. Construct 3 displayed an intermediate profile, despite harboring the highest number of cysteine deletions, with a peak of $\sim 2.3 \times 10^6$ RNA1 copies and $\sim 5.68 \times 10^5$ RNA2 copies at 21 dpi. The Δ VSR construct showed low viral loads for both RNA segments, with $\sim 4.0 \times 10^5$ RNA1 copies and $\sim 1.60 \times 10^5$ RNA2 copies at 21 dpi. Healthy plant controls exhibited values ranging from 16 to 700 copies at all time points for both RNA1 and RNA2, indicating baseline noise. The results also suggest that when RNA1 constructs carrying deletions are agroinfiltrated together with RNA2-LAV-PDS, low levels of post-transcriptional gene silencing (PTGS) and reduced viral replication of RNA2-LAV-PDS are induced. Furthermore, these findings are highly relevant for the development of viral vectors for heterologous expression. The efficiency of such systems depends on a balance between viral replication and host viability. While the wild-type shows high replication capacity, its high virulence limits its applicability. In contrast, constructs 1–3, which retain partially functional VSR activity, exhibit a more suitable profile, allowing sustained infection with reduced physiological impact, thereby favoring stable expression of recombinant proteins. Finally, the attenuation of symptoms observed in clone 2 and clone 4 (mutant) indicates that the structural integrity of the VSR is essential for its virulence.

Keywords: PepRSV; *Nicotiana benthamiana*; cysteine residues; VSR; attenuation.

1. INTRODUÇÃO

Entre as diversas aplicações da biotecnologia vegetal, encontra-se o uso de vírus vegetais seja como vetores de expressão de genes e proteínas heterólogos (Tavares-Esashika *et al.*, 2020; Andrade *et al.*, 2023; Fogaça *et al.*, 2024; Kauffmann *et al.*, 2024; Kauffmann, 2025), seja como vetores de indução de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) (Tavares-Esashika *et al.*, 2022; Unver & Budak, 2009) ou para proteção cruzada (premunização) (Roistacher *et al.*, 2004).

Diversas estratégias de PTGS foram desenvolvidas para promover o silenciamento ou a redução da expressão de genes específicos em plantas. Entre essas estratégias, o silenciamento gênico induzido por vírus (*virus-induced gene silencing*, VIGS) destaca-se como uma ferramenta eficiente para modular, de forma dirigida, os níveis de transcritos do gene-alvo em plantas (Baulcombe, 1999; Dinesh-Kumar *et al.*, 2003). O VIGS constitui uma abordagem não transgênica e de caráter transiente baseada em interferência por RNA (RNAi), na qual vírus vegetais geneticamente modificados (GMs) são empregados como vetores para a introdução de fragmentos específicos de genes-alvo na planta hospedeira, promovendo a supressão pós-transcricional do gene (Zulfiqar *et al.*, 2023). A estratégia de VIGS explora o mecanismo de PTGS intrínseco das plantas, possibilitando a regulação negativa de genes endógenos e promovendo seu silenciamento de maneira específica e eficiente (Rössner, Lotz & Becker, 2022). Os vetores virais utilizados em sistemas de VIGS são majoritariamente derivados de vírus de RNA de fita simples de polaridade positiva (ssRNA+). O vetor viral para VIGS é baseado em um clone infeccioso de vírus vegetal, que carrega parte ou todo o gene da planta em seu genoma. Esse clone infeccioso é geralmente induzido por agroinfiltração e promove PTGS por meio da infecção causada pelo vetor. Após o estabelecimento da infecção sistêmica, o genoma viral recombinante do vetor de VIGS ativa a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), levando à síntese de RNAs de dupla fita (dsRNA) (Voinnet, 2005). Esses dsRNAs são então reconhecidos e clivados pela maquinaria de RNAi da planta, envolvendo enzimas do tipo Dicer (*Dicer-like*), que geram pequenos RNAs interferentes (siRNAs) (Zamore *et al.*, 2000; Elbashir, Lendeckel & Tuschli, 2001). Os siRNAs são incorporados ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), direcionando a degradação ou repressão da tradução de transcritos endógenos complementares à fita anti-sense (Akbar & Zhang, 2022), resultando na inibição específica da expressão gênica (Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009).

Avanços recentes na área incluem o desenvolvimento de vetores VIGS de segunda geração, que apresentam uma faixa de hospedeiros mais ampla e induzem sintomas mais brandos, minimizando efeitos fora do alvo (*off-target*) e aumentando a reprodutibilidade e a

confiabilidade da técnica (Senthil-Kumar & Mysore, 2011). Um exemplo clássico de vetor de VIGS de segunda geração se trata do tobacco rattle virus (TRV).

Nesse contexto, o pepper ringspot virus (PepRSV), inicialmente descrito como um candidato promissor para aplicações em expressão gênica transiente, desponta como uma alternativa potencial para uso como vetor de VIGS, especialmente em regiões onde o TRV enfrenta restrições fitossanitárias, como no Brasil (Tavares-Esashika *et al.*, 2020), principalmente por se tratar de um vírus nativo do país e possuir semelhança filogenética com TRV. Dessa forma, PepRSV foi utilizado como vetor de VIGS em *N. benthamiana*, silenciando o gene *phytoene desaturase* (PDS), que está vinculado à produção de clorofila (Tavares-Esashika *et al.*, 2020). Uma vez que o PDS está na via de síntese da clorofila da *N. benthamiana* e se buscou seu silenciamento mediado por VIGS, esperava-se obter com essas construções o fenótipo de branqueamento das folhas (fenótipo de *bleaching*), indicando que o RNA interferente (RNAi) da *N. benthamiana* silenciou a própria produção de PDS após reconhecimento de sequência parcial desse gene vegetal ter sido inserido no genoma do RNA2 de PepRSV. Dessa maneira, a sequência de 500 pb de PDS estaria sendo utilizada pela maquinaria celular de RNAi da planta, mais precisamente o complexo RISC, silenciando a produção de clorofila da *N. benthamiana* e conseqüentemente causando o embranquecimento (fenótipo de *bleaching*) de suas folhas. Os resultados do uso do PepRSV como vetor de VIGS foram satisfatórios, produzindo inicialmente o fenótipo de *bleaching* nas folhas aos 9 dpi e com pico máximo de expressão fenotípica aos 21 dpi (Tavares-Esashika *et al.*, 2020). Entretanto, o forte sintoma produzido pelo PepRSV pode atrapalhar a interpretação dos resultados.

Além dos fortes sintomas ao utilizar PepRSV como vetor de VIGS, foi observado que PepRSV pode acometer diversas culturas no Brasil e no exterior: PepRSV foi descrito pela primeira vez infectando pimentão (*Capsicum annuum*) (Kitajima & Costa 1969). Todavia, já foi relatado infectando culturas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Silberschmidt *et al.*, 1970; Tavares, 2017) e recentemente, sua ocorrência foi registrada na África do Sul, onde foi associado a danos em lavouras de batata (*Solanum tuberosum*) (EPPO, 2024; Espach *et al.*, 2025). Além disso, seu relato mais recente no Brasil foi em plantas ornamentais de solano-violeta (*Solanum. violaefolium*) em Piracicaba-SP (Bello *et al.*, 2025).

Todavia, o isolado Ag1 de PepRSV, coletado em área de cultivo comercial de tomate estaqueado apresentou taxa de infecção de 22,5% no campo. Essa taxa de incidência elevada evidencia o PepRSV como alvo para o controle da virose na tomaticultura brasileira (Tavares,

2017). Um modo de evitar danos nas lavouras seria por meio da proteção cruzada (premunização).

A proteção cruzada, também denominada premunização, é caracterizada pela capacidade de uma infecção inicial promovida por uma estirpe fraca ou atenuada conferir resistência contra infecções posteriores provocadas por variantes mais virulentas do mesmo vírus ou por vírus estreitamente relacionados do ponto de vista filogenético (Zhang & Qu, 2016; Ziebell & MacDiarmid, 2017; Tuo *et al.* 2020). Esse fenômeno foi demonstrado pela primeira vez utilizando o TMV (McKinney, 1929). O foco da proteção cruzada se baseia na presença de isolados que causam perdas significativas à determinada produção agrícola (Abbas *et al.* 2005).

De acordo com Lecoq (1998), um isolado protetor adequado para uso em proteção cruzada deve causar sintomas mais leves que os isolados normalmente presentes no campo, sem comprometer a produtividade ou a qualidade da cultura. Além disso, precisa apresentar comportamento brando em todos os hospedeiros cultivados, manter estabilidade genética ao longo do tempo, não sendo propenso a evoluir para formas mais severas e ter baixa transmissibilidade por vetores. Ainda é desejável que ofereça proteção contra a maior diversidade possível de isolados severos e que seja fácil de produzir, testar quanto à pureza, armazenar e disponibilizar aos produtores, com um método de inoculação simples e aplicável em campo.

Isolados protetores de citrus tristeza virus (CTV) foram utilizados como método de controle para toranja na África do Sul e na Austrália (Lee *et al.* 1994). Após a introdução do CTV no Brasil na década de 1920, a citricultura brasileira passou a cultivar plantas enxertadas em porta-enxertos tolerantes ao CTV. No entanto, algumas estirpes de CTV ainda causavam danos significativos em laranja-lima, toranja e laranja doce ‘Pera’ enxertadas sobre esses porta-enxertos tolerantes. Os esforços de proteção cruzada foram direcionados a esses isolados (Abbas *et al.*, 2005). No contexto nacional, o uso de isolados premunizantes contra estirpes severas de CTV se tornou um dos exemplos mais emblemáticos dessa estratégia, cuja aplicação em larga escala foi determinante para a proteção de pomares de laranjeiras contra estirpes mais agressivas (Roistacher *et al.*, 2004).

Uma possível solução para mitigar as perdas indesejáveis causadas por PepRSV na tomaticultura brasileira e na bataticultura sul-africana é a utilização de isolados virais atenuados para proteção cruzada. Essa, se trata de uma estratégia considerada eficaz no manejo de doenças virais, sobretudo em culturas que carecem de métodos alternativos de controle ou de cultivares resistentes (Ziebell & MacDiarmid, 2017). Dessa forma, a aplicação de estratégias de proteção

cruzada contra PepRSV se torna uma ferramenta importante para o setor agroeconômico nacional e internacional, uma vez que o PepRSV também acomete plantações de batata na África do Sul (EPPO, 2024; Espach *et al.*, 2025).

A mutagênese sítio-dirigida constitui um método rápido e preciso para gerar mutantes virais atenuados com potencial de uso em estratégias de proteção cruzada (Kung *et al.*, 2014; Cong *et al.*, 2019). Regiões conservadas dos genomas virais desempenham papel fundamental na determinação da virulência (Yoon *et al.*, 2006), enquanto resíduos localizados em regiões hipervariáveis também influenciam diretamente o desenvolvimento dos sintomas (Haikonen *et al.*, 2013). Essas regiões, por sua relevância funcional, configuram alvos estratégicos para a engenharia de mutantes atenuados destinados à proteção cruzada (Cheng *et al.*, 2009).

Diante do exposto, o presente estudo propõe a geração de clones infecciosos com deleções sítio-dirigidas inseridas no gene supressor de silenciamento gênico p16 (VSR), localizado no RNA1 do PepRSV, com o objetivo de reduzir sua atividade supressora e, conseqüentemente, atenuar a severidade dos sintomas. A obtenção de variantes virais atenuadas poderá contribuir tanto para o desenvolvimento de protocolos de premunização baseados em proteção cruzada, quanto para o aprimoramento do PepRSV como vetor de VIGS, contribuindo assim com a produção de ferramentas biotecnológicas estratégicas para estudos de caracterização de genes e proteínas, como para o setor agrônômico, com a produção de premunizante baseado em clone infecciosos atenuados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família *Virgaviridae*

Os vírus agrupados na família *Virgaviridae* compartilham características estruturais e genômicas que refletem estratégias conservadas de infecção em plantas, destacando-se a formação de partículas rígidas e alongadas. A organização de seu genoma se encontra monopartido ou dividido em dois ou três segmentos de RNA genômico de fita simples de polaridade positiva (ssRNA+) encapsidados individualmente, apresentando estruturas típicas como CAP na extremidade 5' e regiões semelhantes a *tRNA-like* na 3' (Adams *et al.*, 2017; Offord, 1966; MacFarlane, 2010).

Essa família é constituída por sete gêneros. São eles: *Furovirus*, *Goravirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus* e *Tobravirus* (Adams *et al.*, 2017).

O modo de transmissão dos virgavirídeos varia de acordo com seu gênero. Os *Goravirus* são transmitidos por pólen (Adams *et al.*, 2017). Já os *Furovirus* e os *Pomovirus* são transmitidos através de plasmodioforídeos. Enquanto isso, os *Pecluvirus* são transmitidos tanto por plasmodioforídeos, quanto por semente. Já os *Hordeivirus* são apenas por sementes. Para o gênero *Tobamovirus*, por não possuírem vetores naturais, a transmissão mecânica e por sementes é os meios de transmissão conhecido (Matthews, 1991). Somente o gênero *Tobravirus* é transmitido por nematoides (Adams *et al.*, 2017). Todavia, essa transmissão dos *Tobravirus* via nematoides se destaca devido a interação vírus-hospedeiro, em que a presença ou ausência de genes localizados em seu RNA2, restringem quais espécies de nematoides atuam como vetores de cada espécie viral.

2.2. Pepper ringspot virus

PepRSV (*Tobravirus capsici*) pertence ao gênero *Tobravirus* e é conhecido no Brasil como vírus da mancha anelar do pimentão. Esse vírus, nativo do Brasil, foi descrito pela primeira vez infectando pimentão (Kitajima & Costa 1969). Todavia, PepRSV já foi relatado infectando culturas de tomate (Silberschmidt *et al.*, 1970). Recentemente, sua ocorrência foi registrada na África do Sul, onde foi associado a danos em lavouras de batata (EPPO, 2024; Espach *et al.*, 2025). Além disso, seu relato mais recente no Brasil foi em plantas de solano-violeta em Piracicaba-SP (Bello *et al.*, 2025).

O gênero *Tobravirus* compreende, até o momento, apenas três espécies reconhecidas: TRV (*Tobravirus tabaci*), pea early-browning virus (PEBV) (*T. pisi*) e PepRSV (Maat, 1963;

Adams *et al.*, 2017). Os membros desse gênero apresentam genoma dividido em dois segmentos distintos, o RNA1 e RNA2, os quais são encapsidados separadamente. Ambos os segmentos consistem em RNA de fita simples com polaridade positiva (ssRNA+), apresentando uma estrutura do tipo CAP na extremidade 5' e uma região estruturalmente semelhante a tRNA na extremidade 3'. As partículas virais são caracterizadas por sua morfologia rígida e alongada, ocorrendo em dois comprimentos, correspondentes às partículas longas de RNA1 e curtas de RNA2, com dimensões aproximadas de 180 a 215 nm e de 46 a 114 nm, respectivamente (Offord, 1966).

O genoma do RNA1 do PepRSV (**Figura 1**) codifica quatro genes que traduzem proteínas associadas à replicação viral, quatro ORFs (“*open reading frame*”) (Tavares-Esashika, 2021).

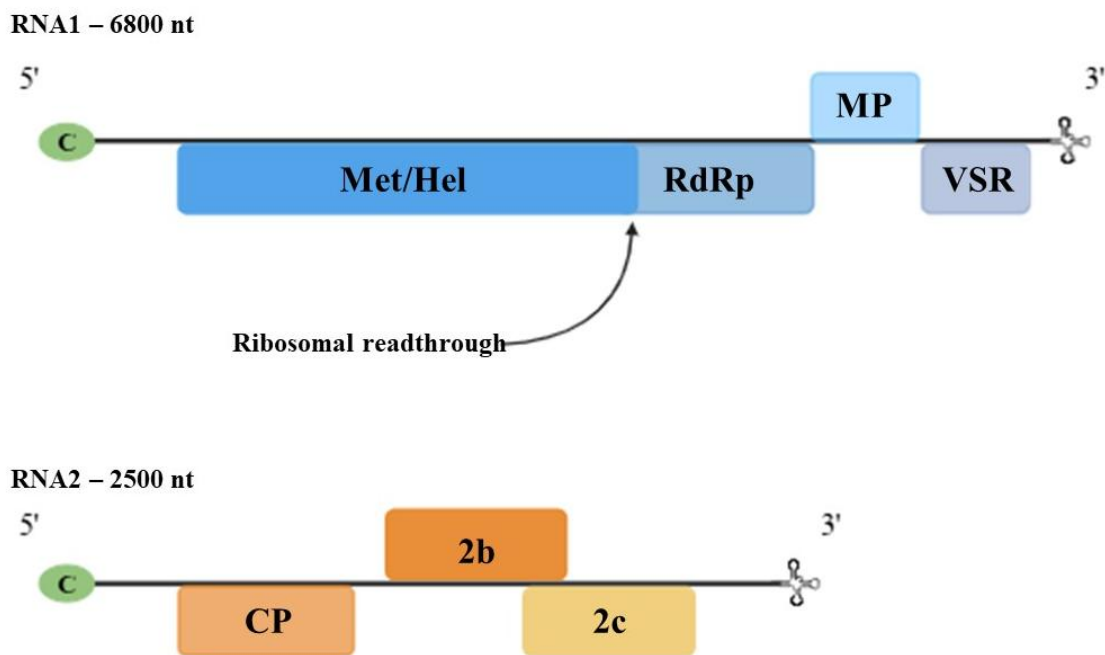


Figura 1. Organização genômica do pepper ringspot virus (PepRSV). O RNA1 e RNA2 (isolado Ag1) possuem uma estrutura CAP na extremidade 5' representado pelo círculo verde com a letra “C”, e uma estrutura semelhante a tRNA na 3'. As ORFs estão representadas pelos retângulos: Met/Hel (metiltransferase/helicase), RdRp (RNA polimerase dependente de RNA), MP (proteína de movimento), VSR (supressor viral de silenciamento gênico, p16), CP (capa proteica), 2b e 2c.

A ORF1a, é denominada como subunidade menor, enquanto a subunidade maior se trata da ORF1ab. A ORF1a contém domínios de metiltransferase e helicase (134-141 kDa), enquanto a ORF1ab gera um sistema de “*leaky stop codon*” ou “*ribosomal readthrough*” e codifica a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), além de metiltransferase e helicase com massa molecular de 194-201 kDa (Koonin, 1991; Rozanov *et al.*, 1992) como proteína fusionada da ORF1ab

(Rodrigues *et al.*, 2015). As proteínas codificadas pela ORF1ab (metiltransferase, helicase e RdRp) são traduzidas diretamente do RNA1, enquanto as proteínas codificadas pelas ORF2 e ORF3 (MP e VSR) são traduzidas a partir dos RNAs sub-genômicos (sgRNAs) (Robinson, 1983; Goulden *et al.*, 1990).

A ORF2 do RNA1 codifica a proteína de movimento (MP) célula-a-célula (29-30 kDa) e a ORF3 codifica o supressor viral de silenciamento gênico (VSR) p16, que tem papel na interferência da formação do complexo RISC por meio de associação com a proteína AGO 4 (Ghazala *et al.*, 2008; Martín-Hernández & Baulcombe, 2008; Rodrigues *et al.*, 2015). O supressor viral de silenciamento gênico p16 (VSR), se trata de uma proteína rica em cisteína (“*cysteine-rich proteins*” ou CRP) (Adams *et al.*, 2017; Ghazala *et al.*, 2008), o que, de acordo com Lukhovitskaya *et al.* (2009), após *motifs* básicos ricos em arginina, as CRPs são *motifs* com potenciais para *zinc-fingers*. Dessa forma, trabalhos voltados para a caracterização desses genes, podem verificar os quanto tais *zinc-fingers* são essenciais para a integridade desse gene.

O RNA2 codifica a CP (22-24 kDa) e as proteínas não estruturais. As proteínas 2b e 2c são localizadas *ad jusante* da CP e estão envolvidas no processo de transmissão de PepRSV por nematoides (Hughes *et al.*, 1986; MacFarlane *et al.*, 1995). O RNA2 apresenta uma variação significativa (1,8–3,9 kb) entre os isolados distintos de *Tobravirus* (**Figura 2**). Em alguns casos, um dos genes 2b e 2c podem apresentar-se ausentes. Em outros, ambos os genes podem estar ausentes do genoma do RNA2. Ainda, de acordo com MacFarlane (2010), a região 3' do RNA2 dos *Tobravirus* pode ser substituída por recombinação com fragmentos 3' do RNA1. Os isolados brasileiros de PepRSV descritos que possuem o RNA2 sequenciado são CAM (NC003670), CAM2, (LC639337), Pivo4 (AB826687), LAV (AB826686), Ag1 (LC842169) e BR (PV807788) (Bergh *et al.*, 1985; Batista *et al.*, 2014; Tavares-Esashika *et al.*, 2020; Tavares-Esashika, 2021; Kauffmann, 2025, Bello *et al.*, 2025). Em 2025 também foi descrito um isolado sul-africano com RNA2 sequenciado, denominado isolado 16 (PP838373) (Espach *et al.*, 2025).

Há diferenças significativas entre a organização genômica desses isolados. O isolado CAM, o primeiro a ser identificado e caracterizado, na região de Campinas-SP, não apresenta os genes codificadores de 2b e 2c (Tavares-Esashika, 2021). Os isolados LAV e Pivo4, por sua vez, foram isolados na região do município de Luziânia-GO (Batista *et al.*, 2014). O isolado LAV possui uma sequência de RNA2 que contém apenas o gene codificador de CP e 2b. Todavia, o gene 2b do isolado LAV não possui homologia com 2b dos demais espécies do gênero *Tobravirus* (TRV e PEBV). Quando se compara os isolados LAV e Pivo4, percebe-se que ocorreu uma deleção de 167 nucleotídeos da extremidade 3' do RNA2 de Pivo4. Tais

deleções resultaram na ausência de 2b e 2c (Batista *et al.*, 2014). O isolado BR, por sua vez, foi identificado na cidade de Piracicaba, SP (Bello *et al.*, 2025). O genoma do RNA2 do isolado BR compartilha cerca de 97,40% a 99,37% de identidade nucleotídica com os demais isolados de PepRSV, com exceções para os genes 2c e 2d, que apresentaram identidade de aminoácidos de 88% e 94,17% quando comparados com o gene 2c do isolado PepRSV_Ag1, respectivamente. O isolado BR apresenta o gene 2c truncado, evento que deu origem ao gene 2d. As funções biológicas de 2a, 2b, 2c e 2d do PepRSV ainda não foram caracterizadas. O isolado BR também apresenta duas sequências emparelhadas de repetição, todavia, sua sequência de emparelhamento é distinta das apresentadas no isolado CAM (Bello *et al.*, 2025). Já o único isolado de PepRSV fora do Brasil, descrito na África do Sul, denominado isolado 16. Seu RNA2 é composto por CP e 2b, de modo que gene 2b do isolado 16 possui um tamanho relativamente maior que o gene 2b de Ag1 (550 pb), Lavrinha (752 pb) e BR (688 pb) (**Figura 2**).

As deleções das proteínas 2b e 2c do RNA2 do PepRSV podem afetar a transmissão por nematoides dos gêneros *Trichodorus* e *Paratrichodorus* (*Trichodoridae*), que são vetores naturais dos membros do gênero *Tobravirus*. Para o PepRSV não é conhecido qual o gênero do vetor de transmissão (Vassilakos *et al.*, 2001). De acordo com Tavares-Esashika *et al.* (2021), tais ausências dos genes codificadores de 2b e 2c podem estar correlacionadas à manutenção contínua do isolado, que devido a sucessivas inoculações mecânicas, induziram os isolados às deleções genômica descritas. Já o isolado recente de PepRSV, se trata do Ag1, que foi identificado em Alexandre Gusmão, Distrito Federal, infectando tomateiro possui a presença de 2b e 2c no RNA2 (Tavares-Esashika, 2021).

De acordo com MacFarlane (2010), o RNA1 de PepRSV possui um tipo de infecção conhecido como NM (não multiplicadora). Enquanto isso, plantas infectadas RNA1 e RNA2 possuem infecção do tipo M (multiplicadora) (Cadman & Harrison, 1959), que resultam na formação de partículas virais (Van Griethuysen *et al.*, 2024). Dessa forma, PepRSV consegue se mover sistematicamente e se replicar na planta ainda que haja a ausência da capa proteica (CP). Isso ocorre devido o RNA2 conter demais proteínas estruturais não-essências para a replicação e movimentação (Tavares-Esashika, 2021), contendo somente CP e a proteína responsável pela transmissão por nematoides, o que resulta numa multiplicação do tipo M (Cadman & Harrison, 1959; Sanger, 1969) e na movimentação através do sistema vascular (Tavares-Esashika *et al.*, 2020).

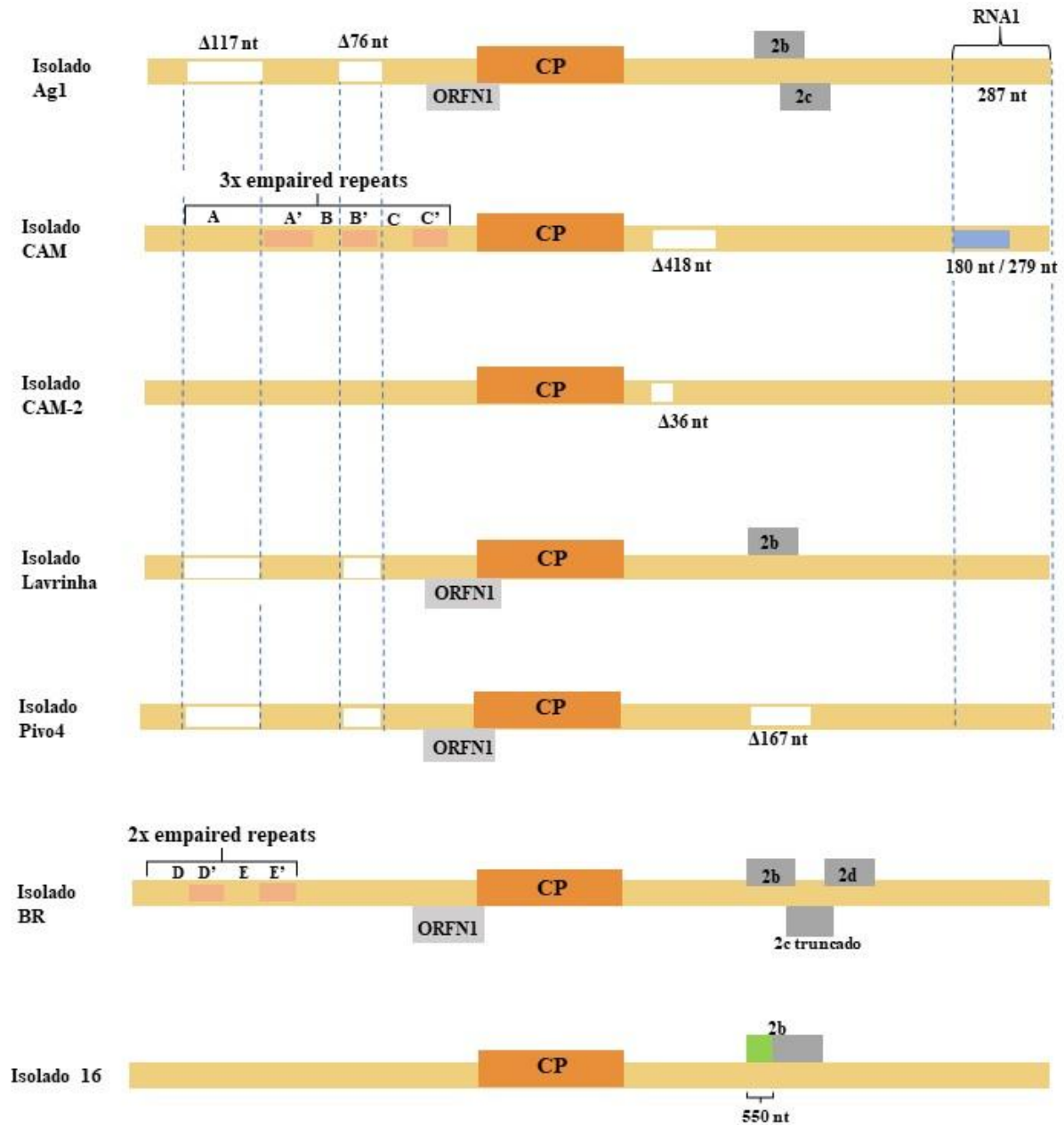


Figura 2. Mapa genético do RNA2 dos isolados Ag1, CAM, CAM-2, Lavrinha, Pivo4, BR e 16 de *pepper ringspot virus* (PepRSV). As deleções identificadas (em cor branca) em cada isolado são indicadas por Δ . Todas as deleções foram analisadas em comparação com isolado Ag1. As deleções de Ag1 foram comparadas ao isolado CAM (o primeiro descrito na literatura). A proteína do capsídeo (CP) é mostrada em laranja-escuro. Os genes 2b, 2c e 2d (que compõem a ORF2) aparecem em cinza-escuro. Os genes 2b e 2c estão presentes juntos apenas no isolado Ag1. O isolado Lavrinha e o isolado 16 apresentam apenas o gene 2b. Todavia, o gene 2b do isolado 16 contém cerca de 550 nt a mais que o 2b de Ag1. O isolado BR possui o gene 2c truncado, dando origem ao gene 2d, exclusivo desse isolado. O gene putativo ORFN1 é representado em cinza-claro, descrito para os isolados Ag1, Lavrinha, Pivo4 e BR. O isolado CAM apresenta, na extremidade 5', três repetições emparelhadas (A–A', B–B' e C–C'). Os isolados Lavrinha e Pivo4 exibem apenas um arranjo A–B. O isolado BR apresenta duas regiões de repetições emparelhadas (D–D' e E–E'), distintas do emparelhamento observado em CAM. Os demais isolados não apresentam região de emparelhamento. Na extremidade 3', todos os isolados (com exceção de BR e 16) compartilham uma região recombinante derivada do RNA1, sendo que o isolado CAM contém um segmento adicional (azul-claro) de 180 nt dentro da região compartilhada de 279 nt, ausentes nos demais isolados.

2.3. Produção de clones infecciosos baseados em *Tobravirus*

Os primeiros clones infecciosos de *Tobravirus* spp. foram obtidos no final da década de 1980, quando Hamilton & Baulcombe (1989) conseguiram reconstruir o RNA1 do TRV (isolado SYM). Enquanto isso, Angenent *et al.* (1989) produziram o RNA2 (isolado PLB). Posteriormente, diversos grupos aperfeiçoaram as técnicas de clonagem, utilizando tanto transcritos *in vitro* quanto vetores binários baseados no promotor 35S do cauliflower mosaic virus (CaMV) e um terminador de *nopalina sintase* (NOS) de agrobactéria, que permitiram a recuperação viral em plantas infiltradas com *Agrobacterium tumefaciens* contendo clones infecciosos (Herrera-Estrella *et al.*, 1983; Zambryski *et al.*, 1983). Nessa última estratégia, que combina o promotor 35S de CaMV com o terminador de NOS, o cDNA do genoma viral é inserido completamente na região do T-DNA, entre o promotor e o terminador. Logo, quando a inoculação é realizada por agroinfiltração, as agrobactérias transformadas com esta construção em plantas susceptíveis, obtêm-se como resultado a transcrição do genoma viral e, logo, sua recuperação dentro da célula infiltrada (MacFarlane *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 1995; MacFarlane *et al.*, 1996; Hellens *et al.*, 2000).

Utilizando a estratégia descrita anteriormente, porém com o plasmídeo pJL89 (Lindbo, 2007; Blawid & Nagata, 2015), que também se trata de um vetor binário, Tavares-Esashika *et al.* (2020) produziram clones infecciosos de PepRSV pela primeira vez. Foram produzidos, a partir de cada isolado (CAM, LAV, Pivo4 e Ag1), clones infecciosos de PepRSV que possuíam propriedades análogas entre si (Tavares-Esashika *et al.*, 2020; Tavares-Esashika, 2021). A combinação dos RNAs (RNA1 + RNA2) dos diferentes isolados de PepRSV, como por exemplo a utilização dos isolados CAM2 (RNA1) /LAV (RNA2) ou CAM2 (RNA1) /Ag1 (RNA2) demonstrou alta infectividade em plantas de *N. benthamiana* (Tavares-Esashika *et al.*, 2020; Tavares-Esashika, 2021). Dessa forma, a caracterização de PepRSV pode ser avaliada também com diferentes combinações de RNA1 e RNA2, gerando dados mais robustos acerca de sua atividade fitopatogênica.

2.4. PepRSV como vetor viral

A expressão heteróloga transiente em plantas, frequentemente mediada por agroinfiltração, consolidou-se como uma estratégia eficiente para a produção de proteínas específicas e para a avaliação funcional de construções gênicas e arranjos de expressão (Sainsbury *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2013). Nesse contexto, os vetores virais vegetais destacaram-se como plataformas de elevada eficiência, ampliando sua aplicação tanto na área biomédica,

como exemplificado pelo uso de PVX no diagnóstico da síndrome de Sjögren (SjS) (Tinazzi *et al.*, 2015), quanto na agricultura e na biotecnologia vegetal. Um exemplo notável é o TRV, empregado como vetor de expressão gênica dupla, também sendo capaz de veicular componentes do sistema CRISPR/Cas para edição gênica dirigida em células vegetais (Guo *et al.*, 2022).

Nas últimas décadas, os estudos de interação patógeno–hospedeiro e o desenvolvimento de produtos biotecnológicos baseados na expressão transiente mediada por *A. tumefaciens* têm recebido crescente atenção, sobretudo em análises funcionais de proteínas (Zhang *et al.*, 2024) e na produção de proteínas recombinantes com aplicações terapêuticas, vacinais, enzimáticas, industriais e agroeconômicas (Buyel, 2024). Adicionalmente, sistemas de expressão transiente baseados em vírus vegetais representam uma alternativa promissora (Akher *et al.*, 2025), devido à sua elevada capacidade produtiva (Hefferon, 2012; Huang *et al.*, 2024) e ao curto intervalo de tempo necessário para a obtenção das proteínas recombinantes (Hefferon, 2017).

Ainda assim, quando comparados à transformação genética estável, os sistemas vegetais de expressão heteróloga transiente apresentam elevados índices de rendimento e eficiência, tornando-se mais vantajosos em relação aos custos e ao tempo necessários para a obtenção de plantas geneticamente modificadas estáveis (Venkataraman & Hefferon, 2021; Eidenberger, Kogelmann & Steinkellner, 2023; Venkataraman *et al.*, 2023; Cabedo, Covarrubias & Handford, 2025).

Nesse cenário, o TRV destaca-se como um vetor viral de elevado desempenho, eficiência e versatilidade, sendo amplamente utilizado tanto para o silenciamento gênico quanto para a expressão heteróloga. Esse vírus é capaz de estabelecer infecção sistêmica com sintomas brandos, preservando a integridade do sistema de expressão e permitindo ampla colonização do tecido vegetal, em função da atuação da MP no transporte célula-a-célula (Ratcliff *et al.*, 2001). Ademais, o TRV apresenta uma vantagem imunológica ao induzir respostas mediadas por PAMPs, o que o torna particularmente atrativo quando comparado a outros vetores virais, como TMV (Kumagai *et al.*, 1995), TGMV (Kjemtrup *et al.*, 1998) e PVX (Ruiz *et al.*, 1998). Em função dessas características, o TRV consolidou-se como uma ferramenta altamente eficaz em pesquisas biotecnológicas.

Entretanto, no contexto brasileiro, o uso do TRV enfrenta entraves fitossanitários relevantes. Por não ocorrer naturalmente nos ecossistemas nacionais, esse vírus é classificado como praga quarentenária pelos órgãos reguladores (Pragas Quarentenárias Ausentes, Portaria SDA/MAPA nº 1.291, de 22 de maio de 2025), o que impõe rigorosas normas fitossanitárias

para sua introdução e utilização em pesquisas conduzidas em território nacional (Ratcliff *et al.*, 2001; Tavares, 2017; Tavares-Esashika, 2021).

Diante dessas restrições e considerando características biológicas semelhantes às do TRV, o PepRSV foi adotado como alternativa para o desenvolvimento de um vetor viral capaz de promover tanto a expressão transiente de genes quanto o VIGS, configurando-se como uma ferramenta relevante para estudos funcionais e genéticos no Brasil (Tavares-Esashika *et al.*, 2022).

O sistema de vetores de VIGS é amplamente utilizado em estudos de genômica funcional por permitir a supressão gênica de forma rápida e eficiente, dispensando a necessidade de obtenção de plantas GM de maneira estável. Essa abordagem mostra-se particularmente relevante para triagens funcionais em larga escala, sobretudo em espécies vegetais consideradas recalcitrantes à transformação genética (Burch-Smith *et al.*, 2006; Becker & Lange, 2010; Zulfiqar *et al.*, 2023). Embora VIGS seja empregado majoritariamente para o silenciamento de genes endógenos das plantas e não diretamente de genes de patógenos ou pragas, a técnica permanece como uma ferramenta robusta para a elucidação da função gênica e para o aprofundamento do entendimento dos mecanismos de resposta e defesa vegetal (Kaur, Chauhan, & Rajam; 2025). Diversos vírus de ssRNA+ de plantas geneticamente modificados têm sido descritos na literatura como vetores de VIGS (**tabela 1**), incluindo o TMV (Kumagai *et al.*, 1995), o TRV (Liu *et al.*, 2002a; 2002b); e o PVX (Lu *et al.*, 2003), os quais têm sido empregados com sucesso no silenciamento de genes-alvo em espécies modelo, como *N. benthamiana* e *Arabidopsis thaliana* (Unver & Budak, 2009; Zulfiqar *et al.*, 2023).

Visando ao aprimoramento das construções gênicas recombinantes baseadas em PepRSV, metodologias modernas de clonagem molecular têm sido incorporadas, com destaque para o método Gibson Assembly (GA). Essa abordagem foi empregada na construção do vetor viral ou clone infeccioso, permitindo a montagem eficiente e precisa de fragmentos de DNA contendo regiões de sobreposição complementar (Tavares-Esashika *et al.*, 2020). O GA baseia-se na complementariedade de bases e na ação coordenada de uma exonuclease T5, que promove a digestão das extremidades 5'-3', gerando regiões simples-fita, seguida pela atuação de uma DNA polimerase termoestável, responsável pelo preenchimento das lacunas, e de uma DNA ligase termoestável, que sela as junções. Esse processo resulta em construções contínuas, sem descontinuidades ou sítios de restrição residuais, conferindo maior flexibilidade à manipulação do DNA genômico ou recombinante (Gibson *et al.*, 2009). Assim, a técnica de GA representa

um avanço significativo na clonagem molecular, ao tornar o processo mais ágil e permitir a construção eficiente de sequências genéticas complexas (Blawid & Nagata, 2015).

O PepRSV tem sido explorado como uma ferramenta biotecnológica para a expressão de genes heterólogos em plantas e sua aplicação incluem a expressão da proteína fluorescente verde (GFP) e de uma xilanase (Tavares-Esashika *et al.*, 2022) e fragmentos parciais dos genes *spike* e nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 (Andrade *et al.* 2023; Fogaça *et al.*, 2024). Em estudo recente, Kauffmann *et al.* (2024) empregou o PepRSV como vetor de expressão para a produção dos nucleocapsídeos recombinantes N1 e N2 de *Coguvirus citrulli* (watermelon crinkle leaf-associated virus 1; WCLaV-1) e *Coguvirus henanense* (watermelon crinkle leaf-associated virus 2; WCLaV-2), respectivamente, com o objetivo de gerar anticorpos específicos contra essas proteínas. Os resultados demonstraram que o sistema baseado em PepRSV constitui uma ferramenta eficaz para a expressão heteróloga, evidenciando seu elevado potencial na produção de antígenos virais vegetais com qualidade e aplicabilidade biotecnológica (Kauffmann *et al.*, 2024).

Tabela 1. Vírus de genoma ssRNA+ utilizados como vetor de silenciamento gênico induzido por virus (VIGS) em plantas.

Gênero	Espécie	Nome do vírus (acrônimo)	Genes silenciados	Planta em que ocorreu o ensaio	Referências
<i>Tobravirus</i>	<i>T. tabaci</i>	tobacco rattle virus (TRV)	PMT (putrescine N-methyltransferase) e TI (trypsin inhibitor)	<i>Nicotiana attenuata</i>	Saedler & Baldwin (2004)
			PDS (Phytoene Desaturase); CH42 (Chlorata42); CUL1 (componente do complexo E3 ubiquitina ligase); RPM1 (gene R contra <i>Pseudomonas syringae</i>); RPS2 (gene R de <i>A. thaliana</i>)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Burch-Smith <i>et al.</i> (2006)
			CaPO2 (<i>Capsicum annum</i> Peroxidase 2)	<i>Capsicum annum</i>	Choi & Hwang (2012)
			SpMPKs 1, 2, 3 e 4 (MAP quinases)	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Li <i>et al.</i> (2013)
			PDS (Phytoene Desaturase)	<i>Hevea brasiliensis</i>	Li <i>et al.</i> (2021)
			NtMYB3 (inibidor da biossíntese de flavonoides)	<i>Chinese narcissus</i>	Zhou <i>et al.</i> (2021)
			ChlH (subunidade H da Mg-chelata sintase)	<i>Ilex dabiesshanensis</i>	Chong <i>et al.</i> (2023)
			CLA1 (altered chloroplast 1)	<i>Hibiscus mutabilis L.</i>	Sang <i>et al.</i> (2024)
			GmRPT4 e GmRpp6907 (Glycine max genes R)	<i>Glycine max</i>	Deng <i>et al.</i> (2025)
			<i>T. capsici</i>	pepper ringspot virus (PepRSV)	Phytoene Desaturase (PDS)
<i>T. pisi</i>	pea early-browning virus (PEBV)	PDS (Phytoene Desaturase); LFY (LEAFY); Korrigan 1 (endo-1,4- β -glucanase)	<i>Pisum sativum</i>	Constantin <i>et al.</i> (2004)	
		Nin (Nodule inception)	<i>Pisum sativum</i>	Constantin <i>et al.</i> (2008)	
		PsSym19 (gene relacionado à simbiose micorrízica arbuscular); PsPT4 (Phosphate transporter 4)	<i>Pisum sativum</i>	Grønlund <i>et al.</i> (2010)	
<i>Tobamovirus</i>	<i>T. tabaci</i>	tobacco mosaic virus (TMV)	Phytoene Desaturase (PDS)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Kumagai <i>et al.</i> (1995)
			ChlH (Mg chelatase H subunit)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Hiriart, Aro & Lehto (2003)
	<i>T. viridimaculatae</i>	Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	Phytoene Desaturase (PDS)	<i>Citrullus lanatus</i> ; <i>Cucumis melo</i> ; <i>Cucumis sativus</i> e <i>Lagenaria siceraria</i>	Liu <i>et al.</i> (2020)
<i>Potexvirus</i>	<i>P. ecspotati</i>	potato virus X (PVX)	Phytoene Desaturase (PDS)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Ruiz, Voinnet & Baulcombe (1998)

<i>Potexvirus</i>	<i>P. ecspotati</i>	potato virus X (PVX)	Histone H4; 16S ribosomal protein L30; Chlorophyll a/b-binding protein; Receptor-like protein kinase; HSP90 (heat shock protein 90)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Lu <i>et al.</i> (2003)
<i>Comovirus</i>	<i>C. siliquae</i>	bean pod mottle virus (BPMV)	Phytoene Desaturase (PDS) e Korrigan 1 (endo-1,4- β -glucanase)	<i>Pisum sativum</i>	Meziadi <i>et al.</i> (2017)
<i>Cucumovirus</i>	<i>C. CMV</i>	cucumber mosaic virus (CMV)	PDS (Phytoene Desaturase); ZmIspH (gene presente na via do metil- D- eritritol-4-fosfato); ZmATG3 e ZmATG8a (relacionados à autofagia)	<i>Zea mays</i>	Wang <i>et al.</i> (2016)
<i>Crinivirus</i>	<i>C. lactucaflavi</i>	lettuce infectious yellows virus (LIYV)	Phytoene Desaturase (PDS)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Qiao & Falk (2018)
<i>Tymovirus</i>	<i>T. brassicae</i>	turnip yellow mosaic virus (TYMV)	GUS (β -glucuronidase)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Pflieger <i>et al.</i> (2008)
<i>Benyvirus</i>	<i>B. necrobetae</i>	beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)	PDS (Phytoene Desaturase); chlH (magnesium chelatase H subunit)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Mohammad <i>et al.</i> (2017)
	<i>B. solibetae</i>	beet soil-borne mosaic virus (BSBMV)	PDS (Phytoene Desaturase); chlH (magnesium chelatase H subunit)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Mohammad <i>et al.</i> (2017)
<i>Cheravirus</i>	<i>C. mali</i>	apple latent spherical virus (ASLV)	PDS (Phytoene Desaturase)	<i>Prunus spp.</i>	Kawai <i>et al.</i> (2016)

2.5. Proteção cruzada e interferência mediada por RNA (RNAi)

A proteção cruzada ou premunização de plantas com cepas atenuadas de vírus fitopatogênicos é considerada uma medida alternativa de controle de patógenos eficaz (Zhu *et al.*, 2023; Agüero *et al.*, 2018; Cong *et al.*, 2019). Esse método de controle de fitoviroses se trata, basicamente, em infectar plantas com cepas mutantes de vírus atenuados de determinada espécie viral para que essas plantas fiquem protegidas de uma possível infecção subsequente por uma cepa virulenta e letal do mesmo vírus (Ziebell & Carr, 2010). De acordo com Pechinger *et al.* (2019), o uso de vírus atenuados por mutações de cepas dominantes pode prover melhor cobertura de proteção. As mutações à serem induzidas no material genético viral podem ser dirigidas tanto em regiões conservadas quanto variáveis, resultando em mutantes atenuados com virulência, patogenicidade e indução de sintomas reduzidos (Raja *et al.*, 2022). Todavia, de acordo com Xu *et al.* (2021; 2024), podem ocorrer de que mutações espontâneas ocorram em vírus mutantes que possuem uma única mutação inserida em seu genoma, alterando, dessa forma sua virulência. Assim, mutantes virais atenuados com inserção de múltiplas mutações, geralmente apresentam baixo risco de reversão da sua virulência (Liu *et al.*, 2017; Tuo *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021; 2024).

Entre os mecanismos de proteção cruzada se destaca a interferência por RNA (RNAi) (Zhu *et al.*, 2023), sobretudo o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), que tem sido empregado para gerar resistência contra diversas espécies de vírus selvagens que acometem plantas de importância (Akbar & Zhang, 2022). O RNAi é comumente constituído de pequenas moléculas de RNAs não codificantes (*small RNA*, sRNAs), divididos em duas classes: os siRNAs (*small interfering RNA*) e os miRNA (*microRNA*) (Sanan-Mishra *et al.*, 2017), a depender da sua origem e processamento. Todavia, os sRNAs atuam no controle e na expressão gênica de forma inibitória, geralmente como fatores que direcionam especificamente proteínas efetoras que se ligam às moléculas de ácidos nucleicos alvos por meio de pareamento de bases, que, invariavelmente terá como componente da maquinaria efetora uma proteína da superfamília Argonauta (Carthew & Sontheimer, 2009).

Em relação à regulação da imunidade vegetal, os miRNAs possuem funções amplamente catalogadas, de modo a incluir a modulação da imunidade das plantas e do crescimento, a modulação da gradação de transcritos de receptores imunes, além da regulação da transdução de sinais (Qiao *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2021). Por outro lado, os siRNAs são conhecidos principalmente por seu papel no silenciamento (degradação) de RNAs virais (Kong *et al.*, 2022).

O silenciamento gênico, por sua vez, ocorre em plantas a partir do reconhecimento de dsRNAs e de seu processamento por proteínas do tipo Dicer, que agem como reguladoras. Esses sRNAs, com tamanho por volta de 20 nucleotídeos, iniciam sua integração aos complexos efetores responsáveis pela repressão ou degradação dos transcritos-alvo (Zamore *et al.*, 2000; Elbashir, Lendeckel & Tuschli, 2001). O silenciamento, tanto por siRNA, quanto por miRNA fará a mesma via bioquímica celular (Akbar & Zhang, 2022), de modo que, após o início de seu processamento e a clivagem de dsRNAs em pequenos fragmentos de 20 e 21 nucleotídeos de sRNAs com auxílio de uma enzima Dicer (Zamore *et al.*, 2000; Elbashir, Lendeckel & Tuschli, 2001). Após o processamento, o duplex de siRNA é separado com auxílio de proteínas associadas ao complexo RISC, utilizando energia da hidrólise de ATP. Nesse processo, a fita passageira é degradada e a fita guia é incorporada ao complexo RISC, onde exercerá sua função regulatória (Akbar & Zhang, 2022). Concomitante ao carregamento da fita guia, a AGO funcionará como uma mediadora para a repressão ou degradação do mRNA alvo devido sua ação endonucleotídica (Haley & Zamore, 2004; Martinez & Tuschli, 2004). Então a região é reconhecida pelo sRNA guia, que clivará o mRNA alvo (Elbashir, Lendeckel & Tuschli, 2001). O mecanismo, dessa forma, utilizará de enzimas de RNA polimerase dependente de RNA, que amplificarão as moléculas de sRNA, produzindo os dsRNAs que serão clivados posteriormente pela Dicer (Wassenegger & Krczal, 2006). E assim, continuará o mecanismo no próximo ciclo de silenciamento.

3. JUSTIFICATIVA

Por compartilhar proximidade taxonômica com TRV, o PepRSV tem sido considerado um candidato promissor para aplicações biotecnológicas, como no desenvolvimento de estratégias de proteção cruzada (ou premunização) para que haja a prevenção de viroses que possam afetar culturas de solanáceas no Brasil, com destaque para o tomateiro, uma vez que o isolado Ag1 de PepRSV apresentou uma elevada taxa de infecção em áreas de cultivo comercial de tomate estaqueado no Brasil.

O emprego de isolados virais atenuados como método de proteção cruzada se trata de uma abordagem amplamente consolidada na fitovirologia. No contexto nacional, um dos exemplos mais emblemáticos dessa estratégia foi o emprego de isolados premunizantes do CTV, cuja aplicação em larga escala foi determinante para a proteção de pomares de laranjeiras contra estirpes mais agressivas do vírus (Roistacher *et al.*, 2004).

Além de seu potencial aplicação em estratégias de proteção cruzada, o PepRSV apresenta relevância como vetor viral para a expressão transiente de proteínas heterólogas em plantas de *Nicotiana benthamiana*. Essa abordagem torna-se particularmente atrativa no contexto brasileiro, uma vez que o TRV é classificado como vírus quarentenário no país (Pragas Quarentenárias Ausentes, Portaria SDA/MAPA nº 1.291, de 22 de maio de 2025).

O TRV destaca-se como um vetor eficiente para estudos biotecnológicos de expressão gênica, sobretudo por induzir respostas sintomatológicas menos severas quando comparado a outros vírus frequentemente utilizados para esse fim, como o tobacco mosaic virus (TMV) (Kumagai *et al.*, 1995), tomato golden mosaic virus (TGMV) (Kjemtrup *et al.*, 1998) e potato virus X (PVX) (Ruíz, Voinnet & Baulcombe, 1998). Em razão dessas características, o PepRSV surge como uma alternativa funcionalmente análoga ao TRV, porém mais compatível com as exigências fitossanitárias vigentes no Brasil.

O TRV, como vetor viral, apresenta determinada vantagem como, por exemplo, a indução de uma ativação menos intensa das respostas de defesa das plantas quando comparado a outros vírus empregados em sistemas de expressão transiente. Essa característica está associada à forma como o TRV é reconhecido pelos mecanismos de imunidade vegetal, em especial pela interação com padrões moleculares associados a patógenos (“*pathogen-associated molecular patterns*” – PAMPs), o que favorece níveis mais elevados de expressão de genes heterólogos (Kumagai *et al.*, 1995; Kjemtrup *et al.*, 1998; Ruíz, Voinnet & Baulcombe, 1998).

Assim, considerando sua similaridade biológica, acredita-se que o PepRSV possa apresentar desempenho semelhante de TRV como vetor viral de VIGS, configurando-se como

uma alternativa promissora para aplicações em pesquisa e desenvolvimento. Ademais, por não ser classificado como vírus quarentenário no Brasil, o PepRSV pode ser empregado no país, oferecendo vantagens do ponto de vista regulatório, além de garantir um nível de biossegurança estratégico para estudos aplicados em biotecnologia. O PepRSV surge como uma alternativa funcionalmente análoga ao TRV, porém mais compatível com as exigências fitossanitárias vigentes no Brasil.

No contexto do desenvolvimento do PepRSV como vetor viral, a caracterização do RNA2 derivado do isolado Ag1 revelou a existência de dois clones com comportamentos fenotípicos distintos: enquanto o clone 2 é capaz de estabelecer infecção sistêmica, o clone 4 apresenta um padrão restrito à formação de lesões localizadas. Durante análises, foi observado que esse fenótipo diferencial do clone 4 derivado do isolado Ag1 está associado à inserção de um nucleotídeo citidina no gene da capa proteica (CP), alteração que resulta na indução de uma resposta hipersensível semelhante à HR (Tavares-Esashika, 2021; Kauffmann, 2025).

Com base nessas observações, o presente estudo propõe o desenvolvimento de variantes atenuadas de PepRSV por meio da inserção de mutações de deleções sítio-dirigidas em códons de resíduos de cisteína no gene supressor viral de silenciamento gênico p16 (VSR), bem como pela deleção completa desse gene. Adicionalmente, pretende-se realizar a caracterização biológica desses clones em plantas de *N. benthamiana* após agroinfiltração, avaliando se as modificações introduzidas no VSR do RNA1 influenciam o padrão de infecção viral e a eficiência de expressão gênica do PepRSV. Dessa forma, busca-se explorar o potencial dessas construções tanto para estratégias de proteção cruzada (premunização) quanto para o aprimoramento de um vetor de VIGS, voltado ao estudo do PTGS.

4. OBJETIVO

Construir mutantes atenuados a partir de deleções inseridas no *motif* de *zinc-finger* do VSR, observar os efeitos da sintomatologia e quantificar os segmentos de RNA1 e RNA2 de PepRSV.

5. METAS

5.1. Construir mutantes de RNA1 de PepRSV, deletando códons de cisteínas no *motif* de *zinc-finger* no gene VSR e prever a conformação proteica de cada mutante utilizando Alphafold.

5.2. Co-infiltrar o RNA1 selvagem e construções mutantes com o RNA2-LAV-PDS e avaliar as reações em plantas agroinfiltradas;

5.3. Co-infiltrar o RNA1 selvagem e construções mutantes com o RNA 2 do clone 2 e do clone 4 (de Ag1) e observar as reações em plantas agroinfiltradas;

5.4. Quantificar por RT-qPCR o RNA1 (selvagem e mutantes) e RNA 2 do clone 2 (Ag1).

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Isolados virais e manutenção

O clone infeccioso do RNA1 de PepRSV utilizado para a inserção das deleções de cisteínas, foi o CAM2. Já o clone infeccioso do RNA2 utilizado para esse estudo foi do isolado LAV, modificado com uma inserção de cerca de 500 pares de bases do gene *phytoene desaturase* (PDS), denominado clone RNA2-LAV-PDS (**Figura 1**), que foi modificado por Tavares-Esashika (2021). Neste trabalho, outros clones de RNA2 oriundo do isolado Ag1 (desenvolvidos por Tavares-Esashika, 2021) foram utilizados; clone 2 e clone 4. Clone 2 é tipo selvagem de RNA2 do isolado Ag1. Entretanto o clone 4 se trata de mutante (com inserção de uma citidina na CP) que causa lesão local (Tavares-Esashika 2021).

RNA2-LAV-PDS

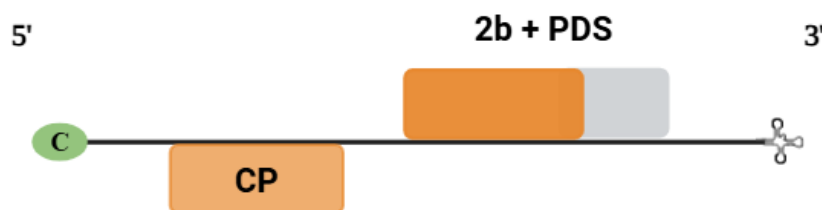


Figura 1. Construção do clone infeccioso do RNA2-LAV-PDS de pepper ringspot virus (PepRSV). O esquema mostra a região codificadora da proteína do capsídeo (CP) e o cassete 2b + PDS, no qual o gene putativo 2b de PepRSV foi quimerizado com um fragmento parcial de 500 pb do gene *phytoene desaturase* (PDS) de *Nicotiana benthamiana* para aplicação em ensaios de silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS).

6.2. Inserção de mutações sítio-dirigidas em clone infeccioso de PepRSV

Com objetivo de diminuir sintoma no vetor de PepRSV, as mutações pontuais no códon de cisteína, possível aminoácido chave de *zinc-finger* do gene supressor viral de silenciamento gênico p16 (VSR), no RNA1, foram introduzidas através da técnica de "site-directed mutagenesis", gerando três construções: Construção 1, deleção de dois códons de cisteínas no terminal N do p16 (Primers: PepR1_VSR_1stC_Del_For/pJL_89_half_GA_Rev, e PepR1_VSR_1stC_Del_Rev/pJL_89_Half_GA_For, **Tabela 1**), Construção 2, deleção de dois

códons de cisteínas no terminal C do p16 (Primers: PepR1_VSR_2ndC_Del_For, Rev, **Tabela 1**), Construção 3, deleção de 4 códons de cisteínas. Além disso, foi feita a deleção completa do gene p16 (Construção 4, clone Δ VSR, construído pelo grupo anteriormente). Para isso, os fragmentos amplificados por PCR, dois fragmentos contendo o genoma do PepRSV, o plasmídeo vetor pJL89, foram preparados utilizando Q5 DNA polimerase (New England Biolabs/NEB, Ipswich, EUA) e ligados pelo método de montagem de Gibson-Assembly (GA) (NEB).

Tabela 1. Pares de primers utilizados para a inserção das deleções sítio-dirigidas no gene supressor de silenciamento gênico (VSR) de PepRSV.

Nome	Sequência dos <i>primers</i> (5' - 3')
PepR1_VSR_1stC_Del_For	AAGAAAAGAGTGCAAGAACGGTTGGTTTCCTGCGATAT
pJL_89_half_GA_Rev	TGGGGATCAAGCCTGATTGGG
PepR1_VSR_1stC_Del_Rev	CGTTCCTGCACTCTTTTCTTTTACATCGAACTTACTA
pJL_89_Half_GA_For	CCAATCAGGCTTGATCCCCAGTA
PepR1_VSR_2ndC_Del_For	GATTACGTGGAAGTCTACTTTCGGCATGAAGCATTTACAAAA
pJL_89_half_GA_Rev	TGGGGATCAAGCCTGATTGGG
PepR1_VSR_2ndC_Del_Rev	TTTTGTAAATGCTTCATGCCGAAGTAGACTTCCACGTAATC
pJL_89_Half_GA_For	CCAATCAGGCTTGATCCCCAGTA

6.3. Transformação, seleção e confirmação da clonagem

Após a ligação dos fragmentos por GA (total de 14 μ L), 7 μ L da solução de ligação foram dialisados em membrana de nitrocelulose para que ocorresse sua dessalinização. Para a transformação de *Escherichia coli* cepa DH10B por eletroporação, foram utilizados 2 μ L de solução de ligação dialisada. Após, as bactérias foram incubadas a 28 °C em meio LB-ágar com canamicina (50 μ g/mL) por 24-48 horas, para diminuir o risco de ocorrer deleções de parte do inserto. O repique foi feito selecionando as colônias e incubando a 28 °C em meio LB-ágar com canamicina (50 μ g/mL) por mais 24 horas. As regiões de interesse como junções entre plasmídeo e inserto e pontos de mutações introduzidas foram amplificadas a partir de PCR com LongAmp DNA polimerase (NEB) e os *amplicons* foram sequenciados pelo método Sanger para confirmação clonagem.

6.4. Predição da estrutura tridimensional da proteína traduzida pelo gene VSR

Sequências de aminoácidos de p16 e mutantes foram deduzidos utilizando o aplicativo, Geneious e essas sequências foram analisadas no software Alphafold 3 (<https://alphafoldserver.com/>) para predição da estrutura tridimensional de cada proteína. As proteínas foram denominadas: VSR_ΔC_N-ter (Construção 1); VSR_ΔC_C-ter (Construção 2) e VSR_ΔC_NC-ter (Construção 3). Os parâmetros de predição utilizados para análise foram os estabelecidos para o Alphafold 3, de acordo com Abramson *et al.* (2024).

6.5. Agroinfiltração de clone infeccioso de PepRSV em plantas de *Nicotiana benthamiana*

As células de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101:pMP90) contendo as construções de RNA1 e RNA2 foram misturados para 1:1 e agroinfiltrado em plantas de *N. benthamiana*. Com essas construções, a bactéria *A. tumefaciens* (cepa GV3101::pMP90) foi transformada por eletroporação e plaqueada em meio LB-ágar contendo canamicina, (50 µg/mL) rifampicina (50 µg/mL) e gentamicina (10 µg/mL). As construções de RNA1 e RNA2 foram incubadas a 28 C em meio líquido sob agitação orbital de 180 rpm por 24 horas separadamente. Após o período de incubação, 2 mL da cultura foram adicionados em 6 mL de tampão de indução completo dos genes "vir" contendo acetoseringona (50 µM final), conforme descrito por Bucher *et al.* (2003), para induzir a expressão dos genes de virulência (genes "vir") da agrobactéria. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 5000 × *g* por 5 minutos e o *pellet* foi ressuscitado em solução de agroinfiltração, composta por meio Murashige-Skoog (Sigma-Aldrich), contendo 10 mM MES (pH 5,6) e 150 µM de acetoseringona), com a concentração da cultura de OD600 = 0,5. A mistura de proporção de 1:1 entre RNA1 e RNA2 foi utilizada para agroinfiltração de 20 plantas de *N. benthamiana* com seis semanas de idade. As folhas foram infiltradas, com uma seringa sem agulha nas quatro extremidades da folha. Em todos os experimentos de agroinfiltração descritos nesse estudo, as diferentes construções de RNA1 sempre foram infiltradas juntamente com o clone RNA2-LAV-PDS na mesma planta.

6.6. Confirmação da infecção e quantificação da carga viral por RT-qPCR

A confirmação da infecção pelo clone infeccioso atenuado foi realizada inicialmente pela observação do surgimento de sintoma. Em paralelo, a infecção também foi confirmada por meio de RT-qPCR. As coletas de amostras para quantificação da carga viral foram em 7, 14 e 21 dpi (dias pós-infiltração). Os pares de *primers* para quantificação da carga viral por RT-qPCR foram

desenhados com base nos dados de sequências depositadas no banco de dados para RNA1 e RNA2 de PepRSV. Os *primers* utilizados foram os descritos na **tabela 2**.

Tabela 2. Primers utilizados para a RT-qPCR.

<i>Locus</i>	<i>Nome</i>	<i>Iniciadores (5' - 3')</i>	<i>Amplicon</i>
MP	qPCR_PepR1_MJr_For_5468	CTAACTTTAGTAGGTTGGGTTTCGG	120 pb
	qPCR_PepR1_MJr_Rev_5588	TGTTTCAGTTAAAGAGCCTGCTAC	
ORFN1	qPCR_PepR2_MJr_For_337	GATTTTGCCTTGCTGATCCACT	129 pb
	qPCR_PepR2_MJr_Rev_466	ATCTTTCCAATTCTCAACCTCGAC	

Para a purificação do RNA, foi utilizado o kit de RNA total (Cellco, São Carlos, Brasil). O kit de RT-qPCR (one-step protocol) com "dye" (tipo SYBR) (Phoneutria Biotecnologia, Belo Horizonte, Brasil) foi utilizado para quantificar o número cópias de RNA1 e RNA2 no método de quantificação absoluta. O plasmídeo do clone infeccioso de PepRSV foi utilizado como controle positivo para a construção das curvas padrão.

7. RESULTADOS

7.1. Predição das estruturas tridimensionais das variantes atenuadas do VSR de PepRSV

Mutações pontuais em códons de cisteína, possível *zinc-finger* do gene supressor viral de silenciamento gênico p16 (VSR), presente no RNA1, foram introduzidas através da técnica de "site-directed mutagenesis", gerando três construções (Construção 1, 2 e 3) (**Figura 1**). Além disso, foi feita a deleção completa do gene p16 (clone Δ VSR).

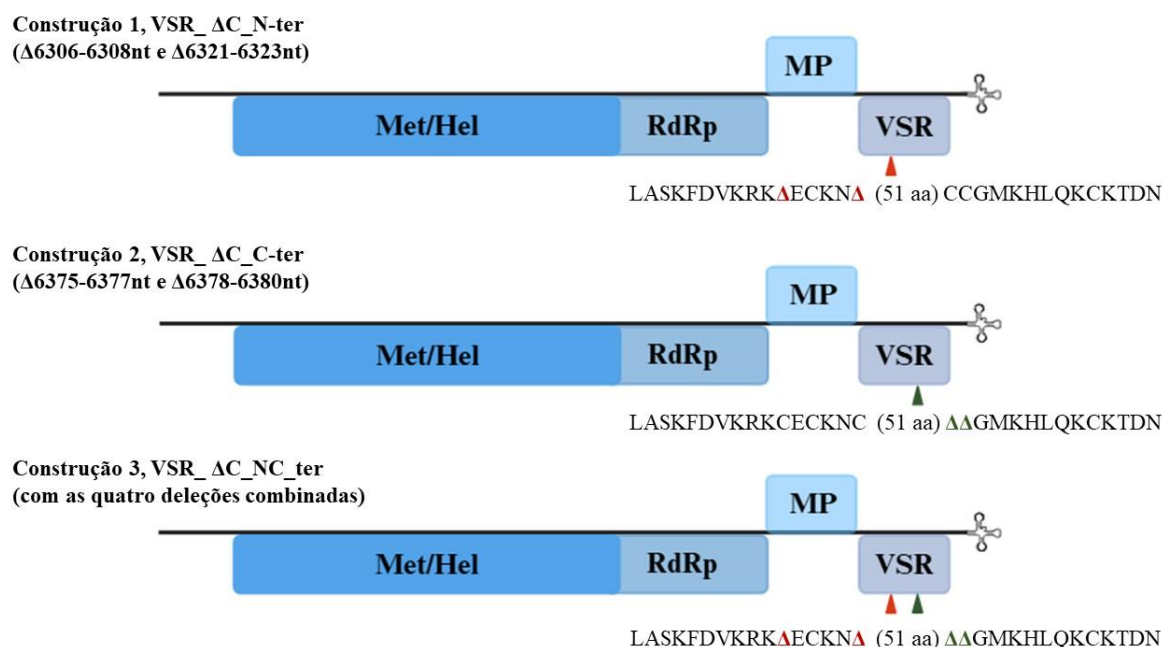


Figura 1. Representação esquemática dos clones infecciosos atenuados de pepper ringspot virus gerados por inserção de mutações pontuais de deleção no gene do supressor de silenciamento gênico p16. As deleções (Δ) correspondem à remoção de nucleotídeos que codificam resíduos de cisteína (TGC/TGT). **Em cor vermelha:** deleções nas posições 6306–6308 nt e 6321–6323 nt (Construção 1, VSR_ Δ C_N-ter). **Em cor verde:** deleções nas posições 6375–6377 nt e 6378–6380 nt (Construção 2, VSR_ Δ C_C-ter). A construção 3 (VSR_ Δ C_NC-ter) combina as quatro deleções presentes nas construções 1 e 2. A sequência de aminoácidos correspondente é apresentada abaixo de cada esquema, destacando visualmente as posições deletadas.

Após sequenciamento Sanger foi feita a predição da estrutura tridimensional do VSR de cada uma das construções (**Figura 2**). A estrutura tridimensional predita para o VSR de PepRSV do isolado selvagem (VSR_selvagem), em comparação com as estruturas preditas para os VSR mutantes da Construção 1 (VSR_ Δ C_N-ter), Construção 2 (VSR_ Δ C_C-ter) e Construção 3 (VSR_ Δ C_NC-ter), demonstrou que houve alteração na conformação das proteínas para todos os clones mutantes com deleção de códons de cisteína inseridas no VSR.

Todavia, destaca-se a Construção 1 (VSR_ Δ C_N-ter), que teve sua estrutura conformacional sem formação de uma α -hélice (localizada na posição entre 93Asp e 106Cys)

após deleção de dois códons, que codificam aminoácidos (aa) de cisteínas nas posições 42 e 47 da sequência aminoacídica do VSR ($\Delta 42\text{Cys}$ e $\Delta 47\text{Cys}$, respectivamente). Por outro lado, Construção 3 (VSR_1 $\Delta\text{C}_{\text{NC_ter}}$) que também possui tais deleções nas posições $\Delta 42\text{Cys}$ e $\Delta 47\text{Cys}$ (que possivelmente podem formar pontes dissulfeto), além de deleções inseridas na região posições 65 e 66 da sequência aminoacídica do VSR ($\Delta 65\text{Cys}$ e $\Delta 66\text{Cys}$, respectivamente), apresentou a formação da estrutura de α -hélice, assim como o VSR_ $\Delta\text{C}_{\text{C_ter}}$ (Construção 2), que possui deleções exclusivamente nas posições $\Delta 65\text{Cys}$ e $\Delta 66\text{Cys}$.

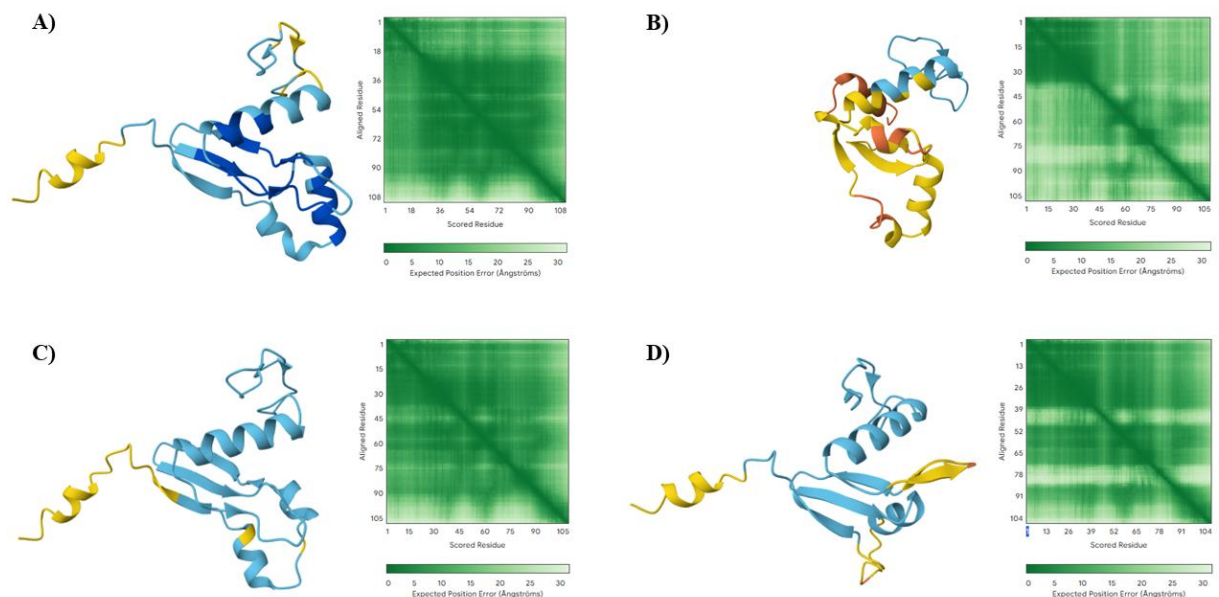


Figura 2. Predição da estrutura conformacional de proteínas mutantes do supressor viral de silenciamento gênico p16 (VSR) de pepper ringspot vírus. (A) Estrutura do VSR selvagem. (B) VSR_ $\Delta\text{C}_{\text{N-ter}}$ (Construção 1), contendo as deleções $\Delta 6306\text{--}6308$ nt e $\Delta 6321\text{--}6323$ nt. (C) VSR_ $\Delta\text{C}_{\text{C-ter}}$ (Construção 2), contendo as deleções $\Delta 6375\text{--}6377$ nt e $\Delta 6378\text{--}6380$ nt. (D) VSR_ $\Delta\text{C}_{\text{NC-ter}}$ (Construção 3), com a combinação das deleções presentes nas construções 1 e 2. As cores utilizadas na predição das estruturas foram dadas pelo AlphaFold 3, indicando o pLDDT (Predicted Local Distance Difference Test), uma métrica de qualidade (parâmetros de saída). A cor Azul escuro indica pLDDT muito alto (> 90). Azul claro, indica pLDDT confiante (entre 70 e 90). A cor amarela indica pLDDT baixo (entre 50 e 70). E a cor laranja indica pLDDT muito baixo (< 50). Ao lado de cada estrutura, em cor verde, encontra-se seu respectivo PAE (Predicted Aligned Error), se tratando da estimativa do erro na posição e orientação relativas entre dois tokens na estrutura predita.

Em análise de acordo com os parâmetros de predição do AlphaFold, a estrutura predita para o VSR selvagem (**Figura 2A**) apresenta um núcleo central bem definido, composto por elementos secundários organizados, como α -hélices e folhas β , com altos valores de pLDDT, indicando elevada confiabilidade estrutural nessas regiões. Em contraste, as porções terminais do VSR selvagem exibem baixos valores de pLDDT e maior variabilidade no mapa de erro predito (PAE), sugerindo caráter desordenado ou flexibilidade conformacional. O valor global de pTM (0,67) indica que, embora o enovelamento geral da proteína seja plausível, há incertezas

na orientação relativa entre diferentes regiões estruturais. A análise do PAE revela boa consistência estrutural no núcleo proteico, com aumento do erro previsto nas extremidades, reforçando a distinção entre regiões estruturadas e flexíveis. Se tratando da estrutura predita para a Construção 1 (VSR_ Δ C_N-ter) (**Figura 2B**), essa apresenta menor confiabilidade global que o VSR selvagem, fato evidenciado pelo valor reduzido de pTM (0,44), indicando incerteza significativa na sua organização tridimensional. O pLDDT da Construção 1 (VSR_ Δ C_N-ter) revela predominância de regiões com confiança baixa e moderada, enquanto o PAE evidencia maior variabilidade estrutural, com aumento do erro esperado entre diferentes regiões da proteína. Embora ainda seja possível identificar elementos secundários nessa construção, como α -hélices e segmentos estruturados, estes se apresentam menos definidos que no VSR selvagem.

Se tratando da Construção 2 (VSR_ Δ C_C-ter) (**Figura 2C**), essa apresenta um nível intermediário de confiabilidade global, evidenciado pelo valor de pTM (0,65), o que sugere que o enovelamento geral da proteína é plausível. A distribuição de pLDDT indica predominância de regiões com confiança no núcleo proteico, especialmente em segmentos que mantêm organização em α -hélices, refletindo uma estrutura central relativamente estável. Em contrapartida, regiões periféricas e/ou terminais exibem valores reduzidos de pLDDT, sugerindo maior flexibilidade ou desordem conformacional. Enquanto isso, a análise do PAE da Construção 2 (VSR_ Δ C_C-ter) revela boa consistência estrutural interna no domínio central, com aumento do erro nas extremidades, indicando menor precisão na definição espacial dessas regiões. Quando se trata da estrutura predita para a Construção 3 (VSR_1 Δ C_NC_ter) (**Figura 2D**), essa apresenta confiabilidade global moderada, indicado pelo valor de pTM (0,59), que sugere que o enovelamento geral da proteína é parcialmente consistente, embora com incertezas na organização espacial. A análise do pLDDT evidencia a presença de um núcleo estrutural relativamente bem definido, com valores elevados concentrados em regiões centrais organizadas em α -hélices e folhas β , indicando maior estabilidade conformacional nesses segmentos. Em contraste, regiões periféricas apresentam valores reduzidos de pLDDT, sugerindo flexibilidade estrutural ou caráter intrinsecamente desordenado. O PAE obtido para a Construção 3 (VSR_1 Δ C_NC_ter) revela boa consistência interna no domínio central, porém com aumento do erro entre regiões distintas, especialmente envolvendo segmentos terminais, indicando menor confiabilidade na orientação relativa dessas porções.

7.2. Sintomas do estabelecimento de infecção do pepper ringspot virus para expressão do silenciamento gênico do *phytoene desaturase* em *N. benthamiana*

Neste ensaio, de três a cinco folhas verdadeiras de 20 plantas de *N. benthamiana* foram infiltradas via agroinfiltração na parte abaxial com as construções derivadas do clone infeccioso de RNA1 (isolado CAM2) sem ou com deleções (Construção 1-3, Δ VSR e selvagem), conjuntamente ao RNA2 (isolado LAV-PDS).

Os sintomas foram observados e registrados durante 30 dias após infiltração (dpi) para todas as construções de RNA1 co-infiltradas com RNA2-LAV-PDS, com o objetivo de avaliar a capacidade de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) do vetor baseado em PepRSV após inserção de deleções sítio-dirigidas no gene supressor viral de silenciamento gênico p16 (VSR), presente no RNA1. O fenótipo padrão esperado para esse experimento era a obtenção de plantas com folhas brancas, sinal do silenciamento efetivo do gene PDS, assim como observado por Tavares-Esashika *et al.* (2021).

Todavia, esse padrão de fenótipo esperado, foi observado apenas nas plantas agroinfiltradas com o RNA1 selvagem (**Figura 3**). O fenótipo esbranquiçado das folhas agroinfiltradas com RNA1 selvagem de PepRSV se trata de um indicativo típico de *knock-down* ou *knockout* do gene PDS (Tavares-Esashika, 2021), demonstrando que os clones infecciosos do RNA1 selvagem de PepRSV constitui uma ferramenta eficaz para ser utilizada como vetor de silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) em plantas de *N. benthamiana*.

Por outro lado, para as construções obtidas a partir da incorporação de deleções sítio-dirigidas no VSR (Construção 1-3 e Δ VSR), o fenótipo de branqueamento das folhas ocorreu de forma parcial. O branqueamento das folhas agroinfiltradas com tais construções iniciaram aos 9 dpi, porém de forma mais branda e assim permaneceram. O ápice do silenciamento do PDS em *N. benthamiana* observada ocorreu aos 21 dpi para todas as construções (**Figura 3**). Além do embranquecimento, foi observado sintomas como nanismo e mosqueado para todas as plantas agroinfiltradas. Entretanto, as plantas infiltradas com as construções 1-3 e Δ VSR apresentaram menor severidade dos sintomas (**Figura 3**). Concluímos que as mutantes não são suficientes para induzir o *knock-out* do gene, mas sim apenas um nível de *knock-down*.



Figura 3. Fenótipos de embranquecimento foliar em *Nicotiana benthamiana* resultantes do silenciamento do gene *phytoene desaturase* utilizando vetores de silenciamento gênico induzido por vírus baseados em versões atenuadas de pepper ringspot virus. Cada coluna corresponde a diferentes variantes do RNA1 (selvagem, Δ VSR e construções de 1-3), todas combinadas com RNA2-LAV-PDS. As imagens foram registradas aos 7, 14 e 21 dias pós-infiltração (dpi) para ilustrar a progressão temporal dos sintomas.

7.3. Sintomas do estabelecimento de infecção e atenuação dos clones 2 e 4 de pepper ringspot vírus em *N. benthamiana* para proteção cruzada

Para esse ensaio, de três a cinco folhas verdadeiras de 20 plantas de *N. benthamiana* foram infiltradas via agroinfiltração na parte abaxial com as construções derivadas do clone infeccioso de RNA1 (isolado CAM2) sem ou com deleções (Construção 1-3, Δ VSR e selvagem), conjuntamente ao RNA2 (clone 2, derivado do isolado Ag1).

O mesmo procedimento foi feito para 20 plantas de *N. benthamiana* que foram agroinfiltradas com as mesmas construções derivadas do clone infeccioso de RNA1, conjuntamente ao RNA2 (clone 4, derivado do isolado Ag1). Sabe-se que a partir de observações feitas por Tavares-Esashika (2021), o clone 4 causa lesões necróticas locais por morte celular programada nas folhas de *N. benthamiana*, enquanto o clone 2 causa amarelecimento, nanismo e deformação foliar.

Os sintomas foram observados e registrados durante 30 dias após infiltração (dpi) para todas as construções de RNA1 co-infiltradas com RNA2 Ag1 (clone 2 e 4), com o objetivo de avaliar a atenuação dos sintomas causados por PepRSV clone 2 e clone 4 (mutante), para emprego do vírus atenuado como premunizante em estratégias de proteção cruzada na tomaticultura nacional e na babaticultura internacional, após inserção de deleções sítio-dirigidas de cisteínas no gene supressor viral de silenciamento gênico p16 (VSR), presente no RNA1 de PepRSV.

O fenótipo esperado para o clone 2 é distinto do clone 4. Para o clone 2 o fenótipo com nanismo e amarelecimento das folhas para a construção do tipo selvagem era o esperado. Enquanto para o clone 4, se esperava o aparecimento de necrose local, nanismo e deformação foliar. Para as Construções de 1-3 e Δ VSR do RNA1 (tanto as co-infiltradas com o RNA2 do clone 2, quanto com o RNA2 do clone 4) esperava-se menor severidade dos sintomas, demonstrando que os clones infecciosos do RNA1 de PepRSV foram atenuados e que tais construções possuem potencial biotecnológico para seu emprego como premunizante em estratégias de proteção cruzada.

O fenótipo esperado foi observado para todas as construções de RNA1, seja com deleção pontual (construções 1, 2 e 3), seja com deleção do gene completo (Δ VSR), tanto co-infiltradas com o RNA2 do clone 2 (**Figura 4**), como com o RNA2 do clone 4 (**Figura 6**).

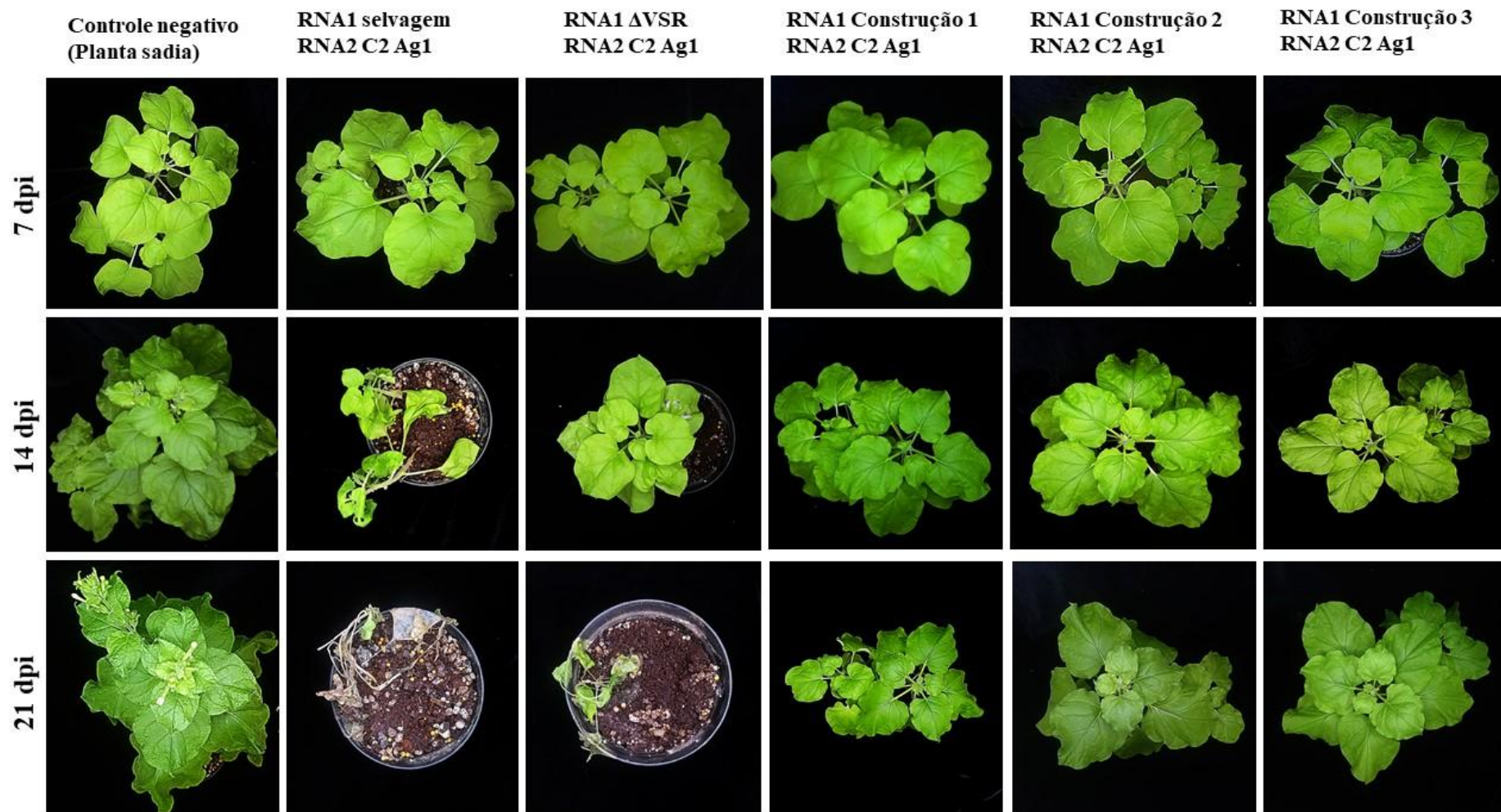


Figura 4. Fenótipos de atenuação de sintomas de infecção viral causados pelas construções de RNA1 de pepper ringspot virus em *N. benthamiana* co-infiltradas com o RNA2 do clone 2. Cada coluna corresponde a diferentes variantes do RNA1 (selvagem, Δ VSR e construções de 1-3), todas combinadas com RNA2 do clone 2. As imagens foram registradas aos 7, 14 e 21 dias pós-infiltração (dpi) para ilustrar a progressão temporal dos sintomas.

Para a construção de RNA2 tipo selvagem, para o clone 4 observou-se que além de necrose local causada por morte celular programada, registrou-se sintomas de maior severidade, com necrose foliar extensa acompanhada de murcha (**Figura 5**, A e B, respectivamente).

Esse ensaio foi repetido duas vezes, pois, devido à severidade dos sintomas causados pelo clone 4, plantas jovens de *N. benthamiana* se demonstraram mais susceptíveis, de modo que as lesões causadas por morte celular programada típicas do clone 4 levarem todas as plantas à morte em cerca de 10 dias pós-infiltração (dpi). Ainda que o segundo ensaio tenha sido realizado dentro do protocolo estabelecido de 28 dias de idade para as plantas de *N. benthamiana*, a construção do tipo selvagem do clone 4 causou morte nas plantas aos 16 dpi. Para o clone 2 não foi observado mortes causadas pelos sintomas de PepRSV, mas sim devido à possível contaminação por bactérias de solo durante a última semana de avaliação. A avaliação dos sintomas de murcha bacteriana foram observados e registrados.

Por fim, observou-se que as construções derivadas do RNA1 do isolado CAM2 (construções 1, 2, 3 e Δ VSR) causaram sintomas atenuados quando comparados aos clones do tipo selvagem, de modo que esse padrão de menor severidade de sintomas foi observado tanto para as plantas co-infiltradas com a combinação de RNA1/RNA2 utilizando o RNA2 do clone 2, quanto do clone 4 (ambos derivados do isolado Ag1).

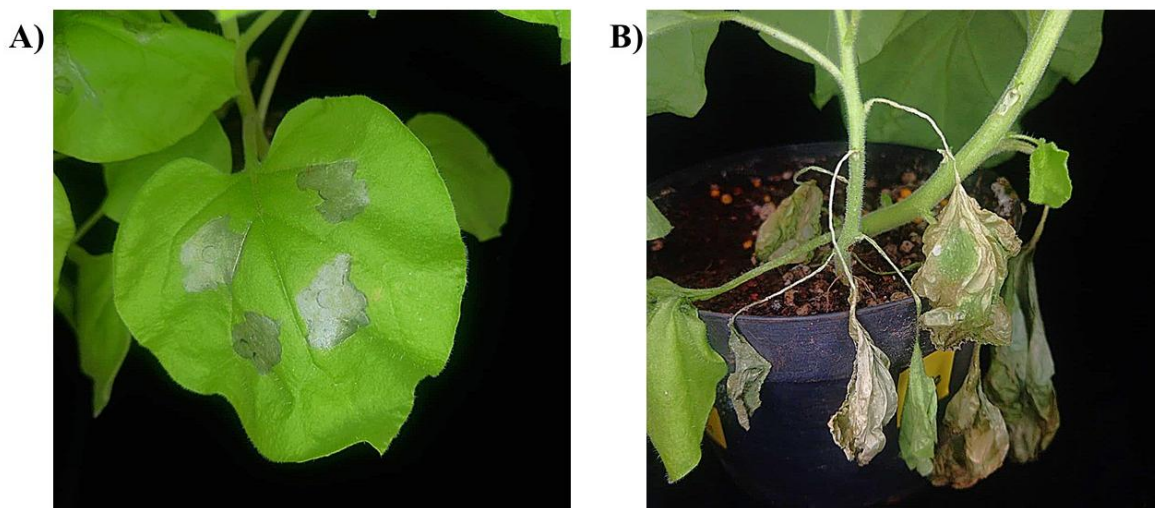


Figura 5. Sintomas de infecção viral induzidos em *N. benthamiana* após agroinfiltração do isolado selvagem de RNA1 de pepper ringspot virus combinado com o RNA2 do clone 4 (derivado de Ag1). (A) Formação de lesões necróticas locais nas folhas agroinfiltradas, caracterizadas por manchas irregulares de coloração cinza a marrom, resultantes de morte celular programada local associada à resposta hipersensível da planta. (B) Necrose foliar severa acompanhada de murcha e colapso do tecido, observada nas folhas inferiores, com enrugamento e perda de turgidez da lâmina foliar, indicando progressão da necrose e comprometimento fisiológico do tecido vegetal.

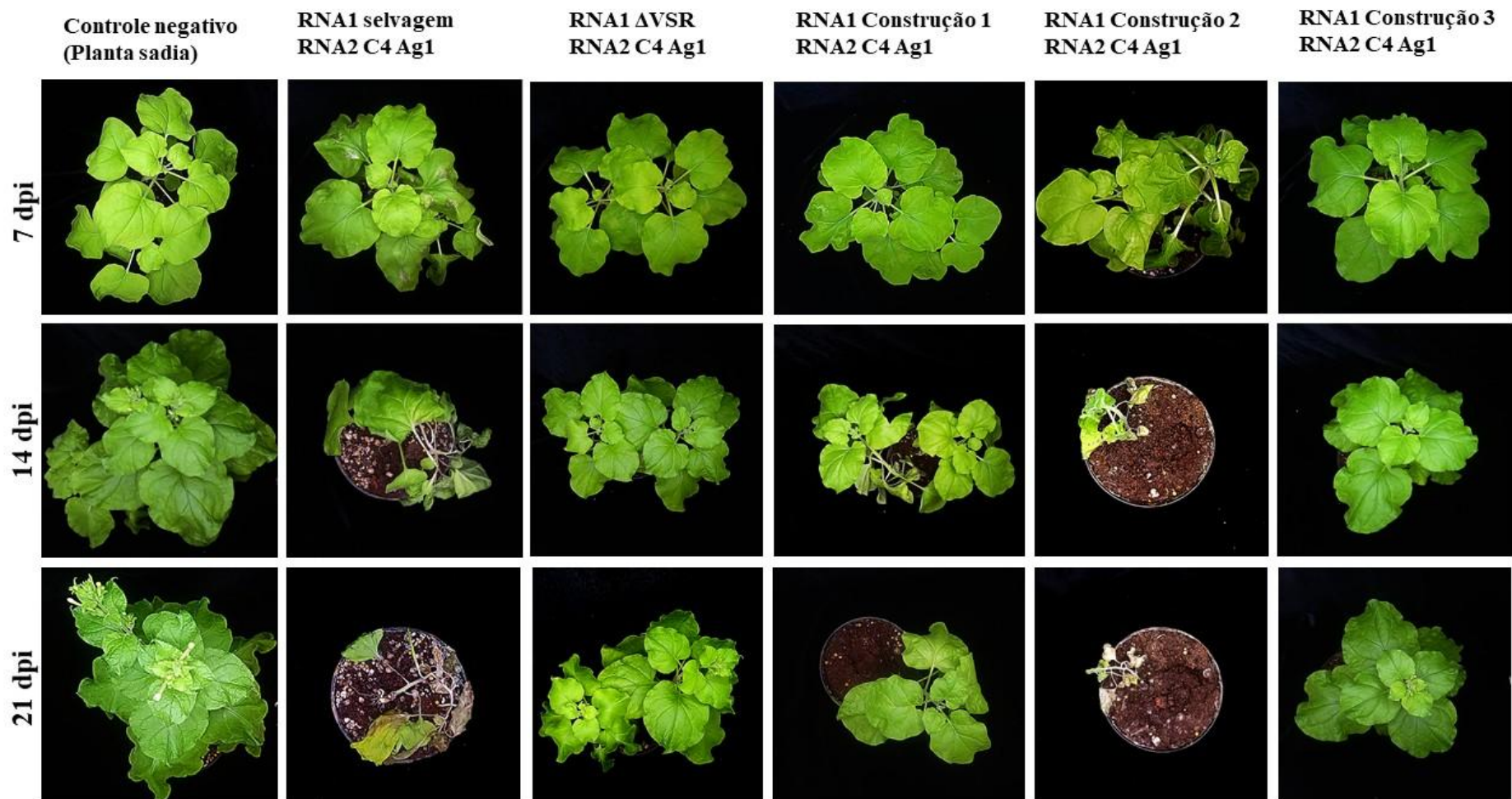


Figura 6. Fenótipos de atenuação de sintomas de infecção vital causados pelas construções de RNA1 de pepper ringspot virus em *N. benthamiana* co-infiltradas com o RNA2 do clone 4. Cada coluna corresponde a diferentes variantes do RNA1 (selvagem, Δ VSR e construções de 1-3), todas combinadas com RNA2 do clone 4 (mutante derivado do isolado Ag1). As imagens foram registradas aos 7, 14 e 21 dias pós-infiltração (dpi) para ilustrar a progressão temporal dos sintomas.

7.4. Análise da curva-padrão e da curva de dissociação das construções de RNA1 co-infiltradas com o RNA2 do clone 2 (isolado Ag1) por RT-qPCR one step

Para avaliar as reações da RT-qPCR, foi produzida uma curva-padrão com base no log 10 do nº de cópias de cada diluição (eixo x) e seus respectivos valores de Cq (eixo y), utilizando cinco diluições seriadas 1:10 (10 ng, 1ng, 10⁻¹ ng, 10⁻² ng e 10⁻³ ng), em triplicata.

O coeficiente de regressão linear igual ou acima de 0,950 para todas as diluições de ambos os segmentos de RNA, indicam uma correlação forte e positiva entre as variáveis. A eficiência das reações foi calculada pela fórmula:

$$E = (10(-1/\text{inclinação}) - 1) \times 100$$

Onde:

E = Eficiência da reação de RT-qPCR;

Inclinação = a taxa de variação da linha de tendência linear baseada em dados conhecidos de Y e X.

Sendo:

Y = diluição em Log;

X = Cq médio da reação de RT-qPCR em triplicata.

A faixa dinâmica de detecção para ambos os segmentos de RNA variou de 1 a 5 unidades de log 10 do nº cópias do DNA plasmidial (**Figura 7; Tabela 1**).

A especificidade das reações foi avaliada pelas curvas de dissociação (*melting curve*) que apresentaram pico único para cada conjunto de primers e para cada diluição (**Apêndice A**).

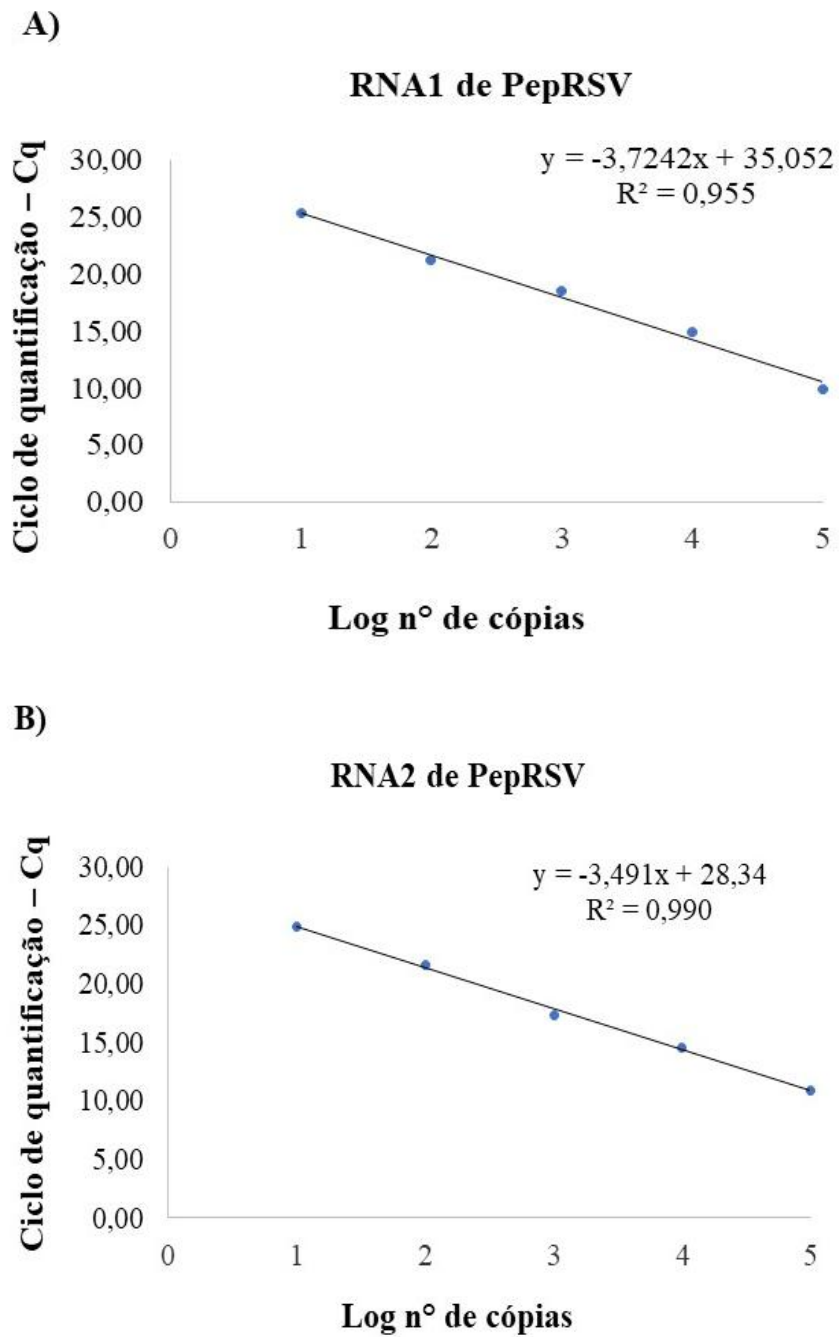


Figura 7. Curvas-padrão de cinco diluições seriadas (1:10) geradas a partir do log 10 do número de cópias do DNA plasmidial recombinante contendo a sequência-alvo específica de cada RNA de PepRSV versus ciclo de quantificação (Cq). **A** – RNA1 de PepRSV. **B** – RNA2 do clone 2 de PepRSV.

Tabela 1. Avaliação da curva-padrão de RT-qPCR de cada segmento genômico de RNA de PepRSV para menor diluição testada (10^{-3} ng).

RNA	Tamanho do DNA plasmidial (pb)	Eficiência (%)	R ²	Diluição	Tm média (°C)	Valor médio de Cq
RNA1	6.800	86,13914	0,955	10 ¹ ng	80.105	9,944
				1 ng	80.225	14,886
				10 ⁻¹ ng	80.355	18,549
				10 ⁻² ng	80.405	21,209
				10 ⁻³ ng	80.505	25,312
RNA2	2.500	93,39898	0,9962	10 ¹ ng	82.604	10,931
				1 ng	82.654	14,609
				10 ⁻¹ ng	82.604	17,287
				10 ⁻² ng	82.704	21,636
				10 ⁻³ ng	82.704	24,872

Após a obtenção da curva-padrão para cada segmento de RNA (RNA1 e 2) de PepRSV, foram feitos os ensaios com as amostras de RNA extraído de cada tratamento agroinfiltrado em *N. benthamiana* para quantificação do número de cópias de RNA viral de cada segmento genômico (**figuras 8 e 9, tabelas 2 e 3**) e submetidos à análise de variância ANOVA (**tabela 4 e 5**).

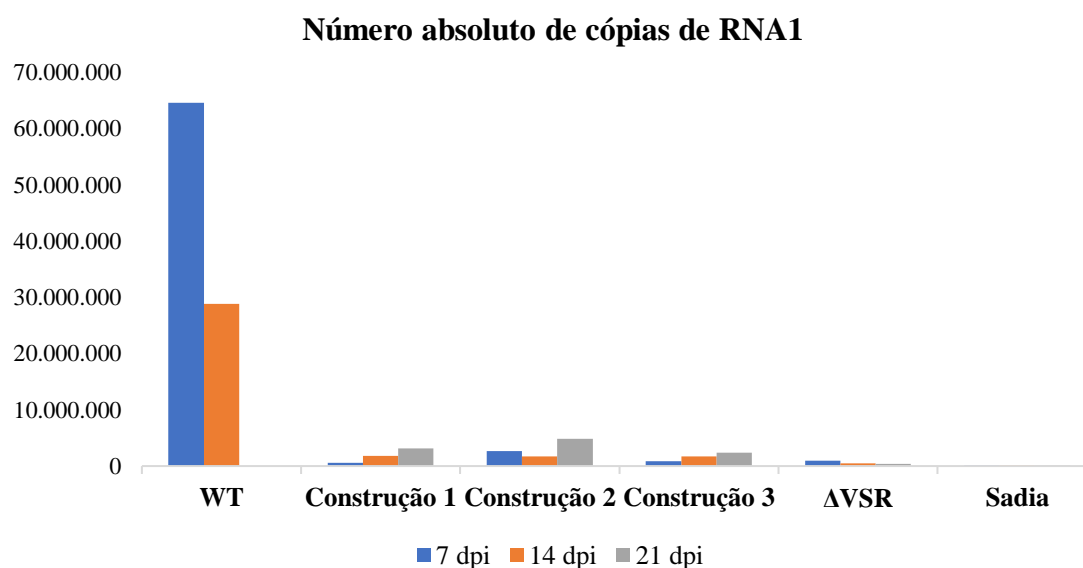


Figura 8. Gráfico do número de cópias do segmento genômico do RNA1 de cada construção de PepRSV quantificadas por RT-qPCR absoluta. Os tratamentos se encontram separados por dpi (dia pós-infiltração) para cada construção. **Wt** (“*Wild tipe*”) = tipo selvagem (controle positivo); **ΔVSR** = Construção com p16 (VSR) deletado; **Sadia** = controle negativo; “**dpi**” = dias pós-infiltração. **Barras em azul** representam amostras coletadas aos 7 dpi; **barras em laranja**, aos 14 dpi; e **barras em cinza**, aos 21 dpi.

Tabela 2. Quantificação absoluta do número de cópias do segmento genômico de RNA1 das construções de PepRSV.

Dias de coleta	Cópias de RNA1					
	Wt	C1	C2	C3	Δ VSR	Sadia
7 dpi	64.606.164	562.137	2.623.935	867.866	1.002.674	721
14 dpi	28.795.960	1.838.035	1.677.682	1.755.807	497.789	552
21 dpi	Ob ¹	3.131.698	4.873.118	2.350.482	400.426	570

Wt (“*Wild tipe*”) = tipo selvagem (controle positivo); **C1** = Construção 1; **C2** = Construção 2; **C3** = Construção 3; **Δ VSR** = Construção com p16 (VSR) deletado; **Sadia** = Planta Sadia (controle negativo); “**dpi**” = dias pós-infiltração. ¹**Ob** = Óbito do tratamento de *N. benthamiana* devido infecção bacteriana.

Número absoluto de cópias de RNA2

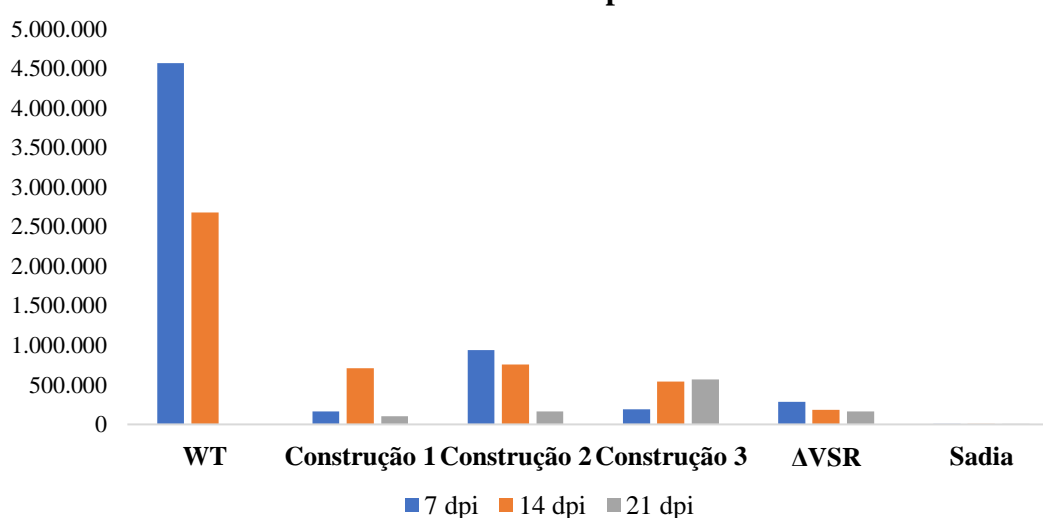


Figura 9. Gráfico do número de cópias do segmento genômico do RNA2 do clone 2 (co-infiltrado com cada construção de RNA1 de PepRSV) quantificadas por RT-qPCR absoluta. Os tratamentos se encontram separados por dpi (dia pós-infiltração) para cada construção. **Wt** (“*Wild tipe*”) = tipo selvagem (controle positivo); **Δ VSR** = Construção com p16 (VSR) deletado; **Sadia** = controle negativo; “**dpi**” = dias pós-infiltração. **Barras em azul** representam amostras coletadas aos 7 dpi; **barras em laranja**, aos 14 dpi; e **barras em cinza**, aos 21 dpi.

Tabela 3. Quantificação absoluta do número de cópias do segmento genômico de RNA2 do clone 2 de PepRSV.

Dias de coleta	Cópias de RNA2					
	Wt	C1	C2	C3	Δ VSR	Sadia
7 dpi	4.567.451	160.980	939.980	189.532	286.206	16
14 dpi	2.681.406	708.253	755.333	541.276	182.555	76
21 dpi	Ob ¹	101.635	162.891	568.862	160.928	138

Wt (“*Wild tipe*”) = tipo selvagem (controle positivo); **C1** = Construção 1; **C2** = Construção 2; **C3** = Construção 3; **Δ VSR** = Construção com p16 (VSR) deletado; **Sadia** = Planta Sadia (controle negativo); “**dpi**” = dias pós-infiltração. ¹**Ob** = Óbito do tratamento de *N. benthamiana* devido infecção bacteriana.

O isolado tipo selvagem apresentou níveis de acúmulo viral muito superiores aos demais tratamentos, tanto para RNA1, quanto para RNA2, especialmente nos estágios iniciais da infecção, indicando alta eficiência replicativa. As construções 1-3 exibiram níveis intermediários de acúmulo viral ao longo do tempo, sugerindo que tais mutações comprometem parcialmente a função do VSR. Por outro lado, o mutante Δ VSR apresentou níveis reduzidos e decrescentes de cópias virais, indicando forte prejuízo na capacidade de manutenção da infecção. O controle negativo (Sadia) manteve níveis basais ao longo de todo o experimento, confirmando a ausência de amplificação inespecífica e a confiabilidade da quantificação.

Os dados analisados indicam que o isolado selvagem apresentou altíssima replicação inicial, superior a todos as demais construções. Houve uma queda entre 7 e 14 dpi, tanto para RNA1 (de $\sim 6,46 \times 10^7$ cópias para $\sim 2,88 \times 10^7$ cópias), quanto para RNA2 (de $\sim 4,56 \times 10^6$ cópias para $\sim 2,68 \times 10^6$ cópias), possivelmente associadas à resposta antiviral da planta de *N. benthamiana* ou a danos fisiológicos severos. Além disso, a morte da planta de *N. benthamiana* aos 21 dpi não foi causada devido à alta virulência, mas sim, devido a infecção por bactéria de solo que contaminou o vaso em que estava o tratamento.

Todas as construções possuem uma replicação mais baixa que o tipo selvagem, mas ainda apresentaram um aumento progressivo ao longo do tempo. A Construção 1 apresentou uma replicação moderada do RNA1, saindo de $\sim 5,6 \times 10^5$ cópias aos 7 dpi para $\sim 1,8 \times 10^6$ cópias aos 14 dpi e $\sim 3,1 \times 10^6$ cópias aos 21 dpi. Enquanto isso, teve declínio para RNA2, saindo de $\sim 1,60 \times 10^5$ cópias aos 7 dpi para $\sim 1,10 \times 10^5$ cópias aos 21 dpi. A Construção 2, por sua vez, apresentou a maior carga viral para RNA1 entre as construções com deleções de cisteínas (Construção 1-3), chegando aos 21 dpi, com um número de cópias de $\sim 4,9 \times 10^6$ cópias de RNA1. Enquanto isso, para o RNA2, a Construção 2 chegou aos 21 dpi com aproximadamente $1,62 \times 10^5$ cópias. Por sua vez, a Construção 3 apresentou um perfil intermediário, mesmo possuindo o maior número de deleções de cisteínas entre as três construções de RNA1, saindo de $\sim 8,7 \times 10^5$ cópias de RNA1 aos 7 dpi, para os $\sim 1,7 \times 10^6$ cópias aos 14 dpi e chegando ao máximo de cerca de $\sim 2,3 \times 10^6$ cópias de RNA1 aos 21 dpi. Já o RNA2 da Construção 3, saiu $\sim 1,89 \times 10^5$ cópias aos 7 dpi, para $\sim 5,41 \times 10^5$ cópias aos 14 dpi, culminando em $\sim 5,68 \times 10^5$ cópias. Quando se trata da construção com o p16 deletado (Δ VSR), observou-se que essa apresentou uma baixa carga viral desde o início, tanto para RNA1 quanto para RNA2, tendo uma queda contínua ao longo do tempo, saindo de $\sim 1,0 \times 10^6$ cópias do RNA1 aos 7 dpi, para $\sim 4,0 \times 10^5$ cópias aos 21 dpi. E se tratando do RNA2, Δ VSR, caiu de $\sim 2,86 \times 10^5$ cópias aos

7dpi para $\sim 1,60 \times 10^5$ cópias aos 21 dpi. O controle negativo (planta sadia), obteve valores entre 16 e 700 cópias em todos os tempos para RNA1 e RNA2, indicando um ruído basal.

Tabela 4. Teste de variância ANOVA (*one-way*) por tempo (dpi) para o RNA1.

Tempo	F-value	p-value
7 dpi	3247.39	2.37×10^{-18}
14 dpi	80202.38	1.05×10^{-26}
21 dpi	81517.23	9.55×10^{-27}

Tabela 5. Teste de variância ANOVA (*one-way*) por tempo (dpi) para o RNA2.

Tempo	F-value	p-value
7 dpi	8699.18	6.45×10^{-21}
14 dpi	27656.10	6.26×10^{-24}
21 dpi	38008.61	9.29×10^{-25}

A análise estatística dos dados de quantificação absoluta por RT-qPCR revelou diferenças altamente significativas entre os tratamentos em todos os tempos analisados (7, 14 e 21 dpi), conforme demonstrado pela análise de variância, com valores de $p < 0,001$ em todos os pontos experimentais de ambos os RNAs (RNA1 e RNA2). Os elevados valores de F obtidos indicam que a variação entre os grupos experimentais (Selvagem-Wt, construções 1-3, Δ VSR e controle negativo sadia) é substancialmente maior do que a variabilidade intragrupo, evidenciando um efeito robusto das deleções no gene VSR sobre a replicação viral. Embora a ANOVA não permita identificar diretamente quais grupos diferem entre si, a magnitude das diferenças observadas sugere padrões biologicamente relevantes.

Por fim, os resultados demonstram que o isolado selvagem de PepRSV (Wt) possui alta eficiência replicativa, especialmente nos estágios iniciais da infecção, enquanto as deleções pontuais no gene VSR comprometem significativamente essa capacidade. As construções 1–3 apresentaram acúmulo viral intermediário e progressivo, indicando que as mutações afetam parcialmente a função do VSR, sem eliminá-la de forma completa, ao passo que o mutante com o VSR totalmente removido, o Δ VSR, evidenciou forte redução e declínio contínuo da carga viral, confirmando o papel essencial desse gene na manutenção da infecção. As diferenças observadas reforçam que as alterações no VSR impactam a dinâmica de replicação viral. Assim, os dados evidenciam que a integridade funcional do VSR é determinante para o sucesso

replicativo do vírus, influenciando diretamente o acúmulo dos segmentos RNA1 e RNA2 ao longo do tempo.

8. DISCUSSÃO

Os sintomas como nanismo, amarelecimento e mosqueado apresentados de forma branda para todas as plantas agroinfiltradas com as construções com inserção de deleções de códon de cisteína no supressor viral de silenciamento gênico p16 (VSR) podem indicar menor severidade de sintoma. Entretanto, as combinações das construções com deleções inseridas no RNA1 (Construção 1-3 e Δ VSR) com RNA2-LAV-PDS não induziram o fenótipo de *bleaching* típico do silenciamento de PDS como observado em trabalhos que utilizaram vetores baseados em tobnavirus para VIGS (Kumagai *et al.*, 1998; Tavares-Esashika *et al.*, 2020), indicando níveis baixos de silenciamento gênico. O desempenho reduzido sugere que, embora as deleções atenuem a supressão do RNAi, elas também comprometem a replicação viral, diminuindo a quantidade de RNAs virais necessários para a produção eficiente de siRNAs.

Experimentos envolvendo a deleção das porções N-terminal ou C-terminal da proteína rica em cisteína (CRPs) de p16 de TRV, demonstraram que a integridade completa do quadro de leitura aberta (ORF) desse gene é essencial para a atividade supressora do silenciamento gênico (Ghazala *et al.*, 2008). Dessa forma, mesmo que suas proteínas sejam homólogas e sem variações conformacionais bruscas, as construções de RNA1 (Construção 1-3 e Δ VSR) podem se encontrar sujeitas à atenuação ou à perda da atividade supressora do gene p16 de PepRSV. Diversos trabalhos demonstraram que modificações nas regiões C ou N-terminal de um gene pode comprometer não apenas a sua atividade biológica principal, bem como pode também comprometer sua replicação, ou mesmo induzir sua atenuação (Sacher & Ahlquist, 1989; Ghazala *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009; Sherry *et al.*, 2014; Kuo *et al.*, 2022; Gori-Savellini *et al.*, 2024).

Dessa forma, as deleções de códons de *motifs* de cisteína que foram incorporadas ao genoma de PepRSV, são modificações agressivas para a conformação e função da p16, impactando diretamente na sua conformação de α -hélice na região N-terminal. Essas deleções, encontradas nas posições Δ 42Cys e Δ 47Cys da Construção 1 e 3, modificaram a estrutura da proteína codificada pelo gene p16 a ponto de não haver conformação de uma das três α -hélices conforme predição do AlphaFold 3 para a Construção 1. Assim, pode-se inferir que as deleções de *motifs* de cisteína na região N-terminal do VSR (Δ 42Cys e Δ 47Cys) se trata de uma mutação agressiva para a funcionalidade do p16 como gene supressor de PTGS.

A análise comparativa das estruturas preditas para o VSR selvagem e suas construções derivadas (Construções 1–3) evidencia diferenças relevantes organização conformacional. A confiabilidade das estruturas foi avaliada com base nas métricas pLDDT, PAE e pTM, amplamente reconhecidas como indicadores robustos da qualidade estrutural (Jumper *et al.*, 2021; Abramson *et al.*, 2024).

O VSR selvagem apresentou um núcleo central bem definido, com altos valores de pLDDT e baixa variabilidade no PAE, indicando elevada confiabilidade estrutural, enquanto regiões terminais mais flexíveis sugerem caráter intrinsecamente desordenado, comum em proteínas envolvidas em interações moleculares (Wright & Dyson, 2015). Em contraste, a Construção 1 ($\Delta C_N\text{-ter}$) apresentou baixa confiabilidade global, com perda de organização estrutural, indicando que a região N-terminal é essencial para o enovelamento proteico (Dobson, 2003). Por outro lado, a Construção 2 ($\Delta C_C\text{-ter}$) manteve o núcleo estrutural preservado, sugerindo que a região C-terminal não é crítica para seu dobramento. Já a Construção 3 (ΔC_NC_ter) apresentou perfil intermediário, com redução na confiabilidade e maior variabilidade estrutural, indicando possível presença de múltiplos estados conformacionais (Abramson *et al.*, 2024). Em conjunto, os resultados indicam que a integridade estrutural da VSR depende principalmente da região N-terminal, enquanto a região C-terminal parece desempenhar papéis mais flexíveis, possivelmente associados à dinâmica e interações moleculares.

Por fim, pode-se considerar que as predições para o VSR selvagem e a Construção 2 possuem alta confiabilidade, podendo ter seus modelos aceitos. Já a Construção 3 possui confiabilidade intermediária, devendo haver cautela nas interpretações de seus dados. Enquanto isso, a Construção 1 possui baixa confiabilidade preditiva, não sendo um modelo adequado.

Interessantemente, a construção de RNA1 com deleção total de p16 (ΔVSR) também conseguiu infectar a planta de forma sistêmica incompleta quando co-infiltrada com RNA2-LAV-PDS, embora o grau de infecção seja aparentemente brando. Isso implica que outro gene pode exercer a função de supressor de PTGS de maneira menos eficiente. Alguns vírus vegetais, como o citrus tristeza virus (CTV), já foram mostrados como possuindo mais de um supressor de PTGS (Costa *et al.*, 2016). Para os tobnavirus, foi demonstrado que a proteína de movimento (MP) de 29k em TRV apresenta função de co-supressão (Deng *et al.*, 2013). Assim, o PepRSV pode conter outros supressores de PTGS além de p16, atuando de forma redundante ou complementar. Dessa maneira, PepRSV poderia ter sua capacidade de replicação comprometida, não produzindo RNAs virais que servisse como molde em quantidade suficiente para o

reconhecimento por parte do sistema imune da *N. benthamiana* e logo para a produção de RNA interferente de modo balanceado. Isso pôde ser observado quando Costa *et al.* (2013) deletou o p16 de TRV e buscou silenciar PDS com dada construção, resultando no fenótipo análogo ao observado em nosso experimento com PepRSV.

Além disso, estudos com cucumovírus (Xu *et al.*, 2013) e nanovírus (Yan *et al.*, 2024), apontam que os resíduos de cisteínas em genes supressores de silenciamento gênico são essenciais para a atividade supressora e para funções associadas, como localização nuclear, ligação a siRNA, de modo que mutações pontuais inseridas nesses genes levam à perda de função ou atenuação da mesma. Em estudos com potyvírus, o resultado de uma única mutação pontual no VSR (substituição de uma lisina no domínio N-terminal por uma asparagina), demonstrou que a mutação de um único aminoácido no gene supressor pode abolir tanto a atividade de supressão de RNAi quanto a indução de sintomas (Del Toro *et al.*, 2018). Assim, as deleções pontuais de códons de cisteínas no p16 de PepRSV, possíveis *zinc-fingers* do gene, podem suprimir sua função biológica principal (atividade de supressor de RNAi), fazendo com que o RNA interferente da planta possa agir com eficiência sobre as diferentes construções de RNA1/RNA2, seja CAM2/LAV-PDS, bem como outras funções biológicas que podem determinar o fenótipo observado de silenciamento parcial do PDS nas plantas de *N. benthamiana*.

Quando o impacto das deleções de códons de cisteínas são analisadas por RT-qPCR, observou-se picos únicos de temperatura de *melting* (T_m) para todos os alvos (RNA1 e RNA2 de PepRSV) (**Apêndice A**). O controle com plantas saudáveis foi relevante para discriminação de falsos positivos por meio da análise da curva de dissociação, pois apesar de tais amostras apresentarem valores de C_q dentro da faixa considerada positiva, esses foram muito baixos quando comparados aos das plantas infectadas com as construções de PepRSV ou com o clone 2 (tipo selvagem).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que mutações no gene VSR impactam significativamente a replicação viral ao longo da infecção, corroborando o papel central dessas proteínas na interação vírus–hospedeiro. A análise estatística por ANOVA revelou diferenças altamente significativas entre os tratamentos em todos os tempos analisados, indicando que as alterações estruturais no VSR afetam de maneira robusta a dinâmica de acúmulo viral.

Além disso, a presença de VSRs está associada à capacidade dos vírus de atingir altos níveis de replicação e causar sintomas severos (Burguán & Havelda, 2011). A redução drástica na carga viral observada no mutante Δ VSR reforça essa função essencial. Trabalhos prévios

demonstram que vírus deficientes em VSR apresentam acúmulo limitado e frequentemente são incapazes de estabelecer infecção sistêmica, devido à ação eficiente do silenciamento de RNA (Voinnet, 2026). Esse comportamento é coerente com a tendência de declínio observada neste estudo, sugerindo que, na ausência do VSR, PepRSV se torna altamente suscetível à defesa antiviral da planta. Todavia, ainda que haja a ausência do VSR no genoma de PepRSV, quando analisamos a expressão de silenciamento causado por VIGS, observamos que pode haver um co-supressor redundante ainda não descrito para PepRSV, assim como observaram no genoma de TRV (Deng *et al.*, 2013), pois ainda que não silenciado o p16, PepRSV conseguiu permanecer de forma sistemática em *N. benthamiana*, mas o silenciamento de PDS foi comprometido, corroborando com os resultados de Deng *et al.* (2013) para TRV. Nesse sentido, sugere-se a melhor caracterização de MP de PepRSV, à luz do estudo citado que caracterizou MP de TRV como supressor redundante.

As construções 1-3 apresentaram fenótipos intermediários, indicando comprometimento parcial da função do VSR. Esse resultado é fortemente suportado por evidências na literatura que demonstram que resíduos específicos (inclusive cisteínas conservadas) são críticos para a atividade supressora (Deng *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2024). Por exemplo, foi demonstrado que mutações em resíduos de cisteína em proteínas VSR comprometem sua capacidade de ligação a siRNAs e sua atividade biológica, sendo essenciais para a função supressora (Ghazala *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2024). De maneira semelhante, alterações pontuais em domínios funcionais de VSRs podem reduzir significativamente sua eficiência, afetando tanto a supressão do silenciamento quanto a patogenicidade viral (Akinyuwa & Kang, 2024). Além disso, o fato de as construções 1-3 ainda manterem alguma capacidade replicativa sugere que os códons deletados, contribuem para a eficiência, mas não são indispensáveis para a função do VSR, o que pode indicar que o VSR de PepRSV (p16) possui múltiplos mecanismos de ação e frequentemente apresentam redundância funcional parcial, assim como demonstrado por Pinczés *et al.* (2024) em estudos de função complementar entre os genes da CP e VSR de cucumber mosaic virus, peanut stunt virus e plum pox virus.

Esses resultados têm implicações diretas para estratégias de proteção cruzada (premunização). As construções atenuadas de PepRSV capazes de estabelecer infecção sem causar danos severos são ideais para induzir resistência contra isolados mais virulentos. Nesse contexto, construções de 1-3 apresentam características compatíveis com agentes premunizantes, uma vez que mantêm replicação suficiente para colonização do hospedeiro, mas com virulência reduzida. Por outro lado, o mutante Δ VSR, devido à sua baixa capacidade

replicativa, provavelmente não seria eficaz nessa aplicação, pois não sustentaria uma infecção protetiva duradoura. Entretanto, neste estudo não realizamos o teste de desafio com isolado forte selvagem do PepRSV. A avaliação da utilidade dos mutantes de RNA1 será feita futuramente por meio desse teste.

As folhas infiltradas com o RNA2 do clone 4 (mutante) apresentaram lesões necróticas locais aos 5 dpi, caracterizadas por manchas irregulares de coloração cinza (ou marrom), bem delimitadas em relação ao tecido saudável. Esse padrão é típico da indução de morte celular localizada, associada à resposta hipersensível (HR), um dos principais mecanismos de imunidade inata em plantas. A resposta do tipo HR é desencadeada pelo reconhecimento específico de componentes virais por proteínas de resistência, levando à morte celular programada no sítio de infecção e restringindo a multiplicação e o movimento do vírus (Jones & Dangl, 2006; Coll; Epple & Dangl, 2011). Em plantas de *N. benthamiana*, tais lesões são comumente observadas poucos dias após a agroinfiltração, sendo amplamente utilizadas como indicador de interação incompatível entre hospedeiro e patógeno. Todavia, tal resposta foi reduzida de forma acentuada quando se compara as plantas agroinfiltradas com CAM2/Ag1 clone 4 com Construção1-3/Ag1 clone 4 ou Δ VSR /Ag1 clone 4 (RNA1/RNA2). Outro sintoma evidenciado no presente estudo, se trata de um quadro mais severo, com necrose foliar extensa acompanhada de murcha, visível pelo enrugamento da lâmina foliar, perda de turgidez e colapso estrutural do tecido. Esse tipo de sintoma sugere uma progressão da infecção ou uma intensificação da resposta de defesa, resultando em níveis mais amplos de morte celular. Durante esse processo, a ativação de vias de sinalização mediadas por espécies reativas de oxigênio (ROS), acúmulo de ácido salicílico e expressão de genes de defesa contribui para a amplificação da resposta, podendo culminar em necrose localizada ou sistêmica (Dodds & Rathjen, 2010; Pallas & García, 2011).

9. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que o supressor de silenciamento gênico p16 (VSR) de pepper ringspot virus é um determinante crítico da eficiência replicativa viral e que resíduos específicos de cisteínas desempenham papel fundamental na modulação de sua atividade supressora.

A remoção total do VSR (Δ VSR) compromete severamente a infecção compromete severamente a infecção de PepRSV, enquanto deleções pontuais (construção de 1-3) resultaram em fenótipos intermediários, evidenciando a importância estrutural e funcional dessas regiões para a interação vírus-hospedeiro.

As construções com deleções de cisteínas de PepRSV (construção de 1-3) exibiram níveis baixos de replicação viral, sugerindo comprometimento da função do VSR mais que esperado, demonstrando que resíduos de cisteína são críticos para a estabilidade estrutural e para a atividade funcional de proteínas virais, incluindo VSRs. O fato de essas construções manterem capacidade de replicação, ainda que bem reduzida, sugere que tais resíduos contribuem para a eficiência do VSR, mas não são absolutamente essenciais para sua função. Essa observação é consistente com o modelo de modularidade funcional dos VSRs, nos quais múltiplos domínios podem atuar de maneira parcialmente redundante na supressão do silenciamento de RNA.

Esses fenótipos intermediários das construções 1, 2 e 3 equilibram a replicação viral e resposta antiviral do hospedeiro. Esse equilíbrio é fundamental não apenas para a compreensão da biologia da infecção viral, mas também para o desenvolvimento racional de aplicações biotecnológicas, incluindo atenuados de PepRSV para proteção cruzada, vetores de expressão heteróloga baseados em tobnavirus e sistemas eficientes de VIGS utilizando a combinação de RNA1/RNA2 com as construções derivadas de CAM2 para RNA1 e para o clone 2 (Ag1) para o RNA2, tanto para proteção cruzada, quanto para vetores de expressão. Por fim, são necessário maiores estudos em nível de silenciamento gênico para uso da combinação Construções 1-3 (ou Δ VSR)/RNA2-LAV-PDS, bem como estudos de interação planta-vírus sobre o clone 4 de PepRSV, sobretudo acerca da imunidade das plantas, para caracterização dos mecanismos causadores de sintomas de lesão necrótica, como a causada pelo clone 4, associado com determinação da carga viral em ensaios de RT-qPCR para compreensão de sua biologia de replicação e interação com o hospedeiro.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, especialmente no que se refere à atenuação dos clones infecciosos do RNA1 de pepper ringspot virus, torna-se essencial a realização de ensaios biológicos complementares para validação das Construções 1-3. Nesse contexto, destaca-se como etapa fundamental futura a condução de testes de desafio entre o isolado selvagem (Wt) e os clones infecciosos atenuados (Construção 1-3), a fim de avaliar a eficiência desses últimos em induzir proteção cruzada (premunização) em hospedeiros suscetíveis.

A premunização é uma estratégia amplamente utilizada em virologia vegetal, baseada na inoculação prévia de isolados atenuados para conferir resistência contra variantes mais virulentas do mesmo vírus. Diversos estudos demonstram que essa abordagem pode ser eficaz na redução da severidade de sintomas e na limitação da replicação viral. No entanto, a eficácia da proteção cruzada depende de fatores como estabilidade genética do clone atenuado, capacidade replicativa e manutenção de determinantes antigênicos relevantes.

Dessa forma, a realização de ensaios de desafio permitirá verificar se os clones do RNA1 de PepRSV desenvolvidos neste trabalho são capazes de estabelecer uma infecção inicial estável e, subsequentemente, proteger a planta contra a infecção pelo isolado selvagem. Além disso, esses experimentos possibilitarão avaliar parâmetros como acúmulo viral, severidade de sintomas e competitividade entre variantes virais, aspectos essenciais para validar o potencial uso desses clones como ferramentas biotecnológicas no manejo de viroses.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, M.; KHAN, M. M.; MUGHAL, S. M.; KHAN, I. A. Prospects of classical cross protection technique against Citrus tristeza closterovirus in Pakistan: A review. **Horticultural Science**, v. 32, n. 2, p. 74, 2005. DOI: <https://doi.org/10.17221/3769-HORTSCI>.
- ABRAHAMIAN, P. E.; SEBLANI, R.; SOBH, H.; ABOU-JAWDAH, Y. Detection and quantitation of two cucurbit criniviruses in mixed infection by real-time RT-PCR. *Journal of virological methods*, v. 193, n. 2, p. 320-326, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.06.004>.
- ABRAMSON, J.; ADLER, J.; DUNGER, J.; EVANS, R.; GREEN, T.; PRITZEL, A.; RONNEBERGER, O.; WILLMORE, L.; BALLARD, A. J.; BAMBRICK, J.; BODENSTEIN, S. W.; EVANS, D. A.; HUNG, C. C.; O'NEILL, M.; REIMAN, D.; TUNYASUVUNAKOOL, K.; WU, Z.; ŽEMGULYTĖ, A.; ARVANITI, E.; BEATTIE, C.; BERTOLLI, O.; BRIDGLAND, A.; CHEREPANOV, A.; CONGREVE, M.; COWEN-RIVERS, A. I.; COWIE, A.; FIGURNOV, M.; FUCHS, F. B.; GLADMAN, H.; JAIN, R.; KHAN, Y. A.; LOW, C. M. R.; PERLIN, K.; POTAPENKO, A.; SAVY, P.; SINGH, S.; STECULA, A.; THILLAISUNDARAM, A.; TONG, C.; YAKNEEN, S.; ZHONG, E. D.; ZIELINSKI, M.; ŽÍDEK, A.; BAPST, V.; KOHLI, P.; JADERBERG, M.; HASSABIS, D.; JUMPER, J. M. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. **Nature**, v. 630, n. 8016, p. 493-500, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>.
- ADAMS, M. J.; ADKINS, S.; BRAGARD, C.; GILMER, D.; LI, D.; MACFARLANE, S. A.; WONG, S. M.; MELCHER, U.; RATTI, C.; RYU, K. H.; ICTV REPORT CONSORTIUM. ICTV virus taxonomy profile: *Virgaviridae*. **Journal of General Virology**, Londres, v. 98, n. 8, p. 1999-2000, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000884>.
- AGÜERO, J.; GÓMEZ-AIX, C.; SEMPERE, R. N.; GARCÍA-VILLALBA, J.; GARCÍA-NÚÑEZ, J.; HERNANDO, Y.; ARANDA, M. A. Stable and broad spectrum cross-protection against Pepino mosaic virus attained by mixed infection. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1810, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01810>.
- AKBAR, S.; WEI, Y.; ZHANG, M. Q. RNA interference: promising approach to combat plant viruses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 5312, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23105312>.
- AKHER, S. A.; WANG, K. Y.; HALL, K.; HUNPATIN, O. S.; SHAN, M.; ZHANG, Z.; GUO, Y. Harnessing transient expression systems with plant viral vectors for the production of biopharmaceuticals in *Nicotiana benthamiana*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 12, p. 5510, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26125510>.
- AKINYUWA, M. F.; KANG, S. H. Functional characterization of RNA silencing suppressor encoded by cotton leafroll dwarf virus. **Agriculture**, v. 14, n. 2, p. 194, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture14020194>.
- ANDRADE, I. A.; FRANCA, L. V.; KAUFFMANN, C. M.; MAEDA, M. H. K.; KOYAMA, L. H. H.; HAMANN, P. R. V.; LOPES-LUZ, L.; FOGAÇA, M. B. T.; CAMARGO, B. R.; RIBEIRO, B. M.; BÜHRER-SÉKULA, S.; NAGATA, T. Practical use of tobavirus-based vector to produce SARS-CoV-2 antigens in plants. **Journal of Virological Methods**, v. 315, p. 114710, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2023.114710>.
- ANGENENT, G. C.; POSTHUMUS, E.; BOL, J. F. Biological activity of transcripts synthesized in vitro from full-length and mutated DNA copies of tobacco rattle virus RNA 2. **Virology**, v. 173, n. 1, p. 68-76, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90222-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90222-5).
- BATISTA, A. R. S.; NICOLINI, C.; RODRIGUES, K. B.; MELO, F. L.; VASQUES, R. M.; MACÊDO, M. A.; INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T. Unique RNA 2 sequences of two Brazilian isolates of Pepper ringspot virus, a tobavirus. **Virus genes**, v. 49, n. 1, p. 169-173, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1066-8>.
- BAULCOMBE, D. C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. **Current opinion in plant biology**, v. 2, n. 2, p. 109-113, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)80022-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80022-3).
- BECHER, A.; LANGE, M. VIGS—genomics goes functional. **Trends in plant science**, v. 15, n. 1, p. 1-4, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.09.002>.
- BELLO, V. H.; NAGATA, T.; RAMOS-GONZÁLES, P. L.; KITAJIMA, E. W. Biological, Cytopathological and Molecular Characterisation of Pepper Ringspot Virus From *Solanum violifolium* in Brazil. **Plant Pathology**, v. 75, n. 1, p. e70131, 2026. DOI: <http://doi.org/10.1111/ppa.70131>.
- BERGH, S. T.; KOZIEL, M. G.; HUANG, S. C.; THOMAS, R. A.; GILLEY, D. P.; SIEGEL, A. The nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA-2 (CAM strain). **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 23, p. 8507-8518, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/13.23.8507>.

- BERTOLINI, E.; MORENO, A.; CAPOTE, N.; OLMOS, A.; DE LUIS, A.; VIDAL, E.; PÉREZ-PANADÉS, J.; CAMBRA, M. Quantitative detection of Citrus tristeza virus in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, n. 2, p. 177-188, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9206-9>.
- BLAWID, R.; NAGATA, T. Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly. **Journal of virological methods**, v. 222, p. 11-15, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.05.003>.
- BURCH-SMITH, T. M.; SCHIFF, M.; LIU, Y.; DINESH-KUMAR, S. P. Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 142, n. 1, p. 21-27, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.106.084624>.
- BURGYÁN, J.; HAVELDA, Z. Viral suppressors of RNA silencing. **Trends in plant science**, v. 16, n. 5, p. 265-272, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.02.010>.
- BUYEL, J. F. Towards a seamless product and process development workflow for recombinant proteins produced by plant molecular farming. **Biotechnology Advances**, v. 75, p. 108403, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108403>.
- CADMAN, C. H.; HARRISON, B. D. Studies on the properties of soil-borne viruses of the tobacco-rattle type occurring in Scotland. **Annals of Applied Biology**, v. 47, n. 3, p. 542-556, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1959.tb07286.x>.
- CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642-655, 2009. DOI: [10.1016/j.cell.2009.01.035](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035).
- CHENG, J.; KOUKIEKOLO, R.; KIELISZKIEWICZ, K.; SAGAN, S. M.; PEZACKI, J. P. Cysteine residues of Carnation Italian Ringspot virus p19 suppressor of RNA silencing maintain global structural integrity and stability for siRNA binding. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 8, p. 1197-1203, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.03.012>.
- CHOI, H. W.; HWANG, B. K. The pepper extracellular peroxidase CaPO2 is required for salt, drought and oxidative stress tolerance as well as resistance to fungal pathogens. **Planta**, v. 235, n. 6, p. 1369-1382, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1580-z>.
- CHONG, X.; WANG, Y.; XU, X.; ZHANG, F.; WANG, C.; ZHOU, Y.; ZHOU, T.; LI, Y.; LU, X.; CHEN, H. Efficient virus-induced gene silencing in Ilex dabieshanensis using tobacco rattle virus. **Forests**, v. 14, n. 3, p. 488, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/f14030488>.
- COLL, N. S.; EPPLE, P.; DANGL, J. L. Programmed cell death in the plant immune system. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, p. 1247-1256, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.37>.
- CONG, Q. Q.; WANG, Y.; LIU, J.; LAN, Y. F.; GUO, Z. K.; YANG, J. G.; LI, X. D.; TIAN, Y. P. Evaluation of Potato virus X mild mutants for cross protection against severe infection in China. **Virology Journal**, v. 16, n. 1, p. 36, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1143-7>.
- CONSTANTIN, G. D.; KRATH, B. N.; MACFARLANE, S. A.; NICOLAISEN, M.; ELISABETH JOHANSEN, I.; LUND, O. S. Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. **The Plant Journal**, v. 40, n. 4, p. 622-631, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02233.x>.
- CONSTANTIN, G. D.; GRØNLUND, M.; JOHANSEN, I. E.; STOUGAARD, J.; LUND, O. S. Virus-induced gene silencing (VIGS) as a reverse genetic tool to study development of symbiotic root nodules. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 21, n. 6, p. 720-727, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-6-0720>.
- COSTA, A. A.; MARTINS, T. R.; MARQUES, N. T.; NOLASCO, G. Combined expression of p20 and p23 proteins from Citrus tristeza virus show enhanced local silencing suppressor activity. **Phytopathologia Mediterranea**, p. 172-183, 2016. DOI: https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-16093.
- DEL TORO, F. J.; MENCÍA, E.; AGUILAR, E.; TENLLADO, F.; CANTO, T. HCP-mediated transmission by aphids of purified virions does not require its silencing suppression function and correlates with its ability to coat cell microtubules in loss-of-function mutant studies. **Virology**, v. 525, p. 10-18, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.09.002>.
- DENG, K.; LU, Z.; YANG, H.; CHEN, S.; LI, C.; CAO, D.; WANG, H.; HAO, Q.; CHEN, H.; SHAN, Z. Efficient Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) Method for Discovery of Resistance Genes in Soybean. **Plants**, v. 14, n. 10, p. 1547, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants14101547>.
- DENG, X. G.; PENG, X. J.; ZHU, F.; CHEN, Y. J.; ZHU, T.; QIN, S. B.; XI, D. H.; LIN, H. H. A critical domain of Sweet potato chlorotic fleck virus nucleotide-binding protein (NaBp) for RNA silencing suppression, nuclear localization and viral pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 4, p. 365-375, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12186>.
- DENG, X.; KELLONIEMI, J.; HAIKONEN, T.; VUORINEN, A. L.; ELOMAA, P.; TEERI, T. H.; VALKONEN, J. P. Modification of Tobacco rattle virus RNA1 to serve as a VIGS vector reveals that the 29K movement protein is an RNA silencing suppressor of the virus. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 26, n. 5, p. 503-514, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1094/mpmi-12-12-0280-r>.

- DINESH-KUMAR, S. P.; ANANDALAKSHMI, R.; MARATHE, R.; SCHIFF, M.; LIU, Y. Virus-induced gene silencing. In: GROTEWOLD, E. (ed.). *Plant Functional Genomics. Methods in Molecular Biology*, v. 236. Totowa: Humana Press, 2003. p. 287-. DOI: <https://doi.org/10.1385/1-59259-413-1:287>.
- DOBSON, C. M. Protein folding and misfolding. *Nature*, v. 426, n. 6968, p. 884-890, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02261>.
- DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, p. 539–548, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg2812>.
- EIDENBERGER, L.; KOGELMANN, B.; STEINKELLNER, H. Plant-based biopharmaceutical engineering. *Nature Reviews Bioengineering*, v. 1, n. 6, p. 426-439, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s44222-023-00044-6>.
- ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development*, v. 15, n. 2, p. 188-200, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.862301>.
- ESPACH, A.; ESTERHUIZEN, L.; AFRICANDER, N.; THIART, S.; READ, D. A.; PIETERSEN, G. First report of pepper ringspot virus on potato (*Solanum tuberosum*) in South Africa. *Journal of Plant Pathology*, Roma, v. 107, p. 1305-1306, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-025-01887-1>.
- EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION (EPPO). First report of pepper ringspot virus in South Africa, damaging potato. Paris: **EPPO**, 2025. Disponível em: < <https://gd.eppo.int/reporting/article-7765> >. Acesso em: 15 de dezembro de 2025.
- FOGAÇA, M. B. T.; LOPES-LUZ, L.; SAAVEDRA, D. P.; BELEM DE OLIVEIRA, N. K. A.; SOUSA, M. B. J.; PEREZ, J. D. P.; ANDRADE, I. A.; CRISPIM, G. J. B.; PINTO, L. S.; FERREIRA, M. R. A.; RIBEIRO, B. M.; NAGATA, T.; CONCEIÇÃO, F. R.; STEFANI, M. M. A.; BÜHRER-SÉKULA, S. Production of antigens expressed in *Nicotiana benthamiana* plant and *Escherichia coli* for the SARS-CoV-2 IgG antibody detection by ELISA. *Journal of Virological Methods*, p. 114969, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2024.114969>.
- GAUTHIER, K.; STRAUCH, C. J.; BONSE, S.; BAUER, P.; HEIDLER, C.; NIEHL, A. Detection and Quantification of Soil-Borne Wheat Mosaic Virus, Soil-Borne Cereal Mosaic Virus and Japanese Soil-Borne Wheat Mosaic Virus by ELISA and One-Step SYBR Green Real-Time Quantitative RT-PCR. *Viruses*, v. 16, n. 10, p. 1579, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/v16101579>.
- GHAZALA, W.; WALTERMANN, A.; PILOT, R.; WINTER, S.; VARRELMANN, M. Functional characterization and subcellular localization of the 16K cysteine-rich suppressor of gene silencing protein of tobacco rattle virus. *Journal of General Virology*, v. 89, n. 7, p. 1748-1758, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.83503-0>.
- GIBSON, D. G.; YOUNG, L.; CHUANG, R. Y.; VENTER, J. C.; HUTCHISON III, C. A.; SMITH, H. O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, v. 6, n. 5, p. 343-345, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.
- GIBSON, U. E.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome research*, v. 6, n. 10, p. 995-1001, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.995>.
- GORI SAVELLINI, G.; ANICHINI, G.; MANETTI, F.; TRIVISANI, C. I.; CUSI, M. G. Deletion of 82–85 N-Terminal Residues in SARS-CoV-2 Nsp1 Restricts Virus Replication. *Viruses*, v. 16, n. 5, p. 689, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/v16050689>.
- GOULDEN, M. G.; LOMONOSSOFF, G. P.; DAVIES, J. W.; WOOD, K. R. The complete nucleotide sequence of PEBV RNA2 reveals the presence of a novel open reading frame and provides insights into the structure of tobnaviral subgenomic promoters. *Nucleic acids research*, v. 18, n. 15, p. 4507-4512, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/18.15.4507>.
- GRØNLUND, M.; OLSEN, A.; JOHANSEN, E. I.; JAKOBSEN, I. Protocol: using virus-induced gene silencing to study the arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Pisum sativum*. *Plant Methods*, v. 6, n. 1, p. 28, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-28>.
- GUO, G.; LI, M. J.; LAI, J. L.; DU, Z. Y.; LIAO, Q. S. Development of tobacco rattle virus-based platform for dual heterologous gene expression and CRISPR/Cas reagent delivery. *Plant Science*, v. 325, p. 111491, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111491>.
- HAIKONEN, T.; RAJAMÄKI, M. L.; TIAN, Y. P.; VALKONEN, J. P. Mutation of a short variable region in HCPro protein of Potato virus A affects interactions with a microtubule-associated protein and induces necrotic responses in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 26, n. 7, p. 721–733, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-13-0024-R>.
- HALEY, B.; ZAMORE, P. D. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nature structural & molecular biology*, v. 11, n. 7, p. 599-606, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/nsmb780>.
- HAMILTON, W. D.; BAULCOMBE, D. C. Infectious RNA produced by in vitro transcription of a full-length tobacco rattle virus RNA-1 cDNA. *Journal of general virology*, v. 70, n. 4, p. 963-968, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-4-963>.

- HEFFERON, K. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. **Virology**, v. 433, n. 1, p. 1-6, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.06.012>.
- HEFFERON, K. Plant virus expression vectors: a powerhouse for global health. **Biomedicines**, v. 5, n. 3, p. 44, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines5030044>.
- HELLENS, R.; MULLINEAUX, P.; KLEE, H. Technical focus: a guide to Agrobacterium binary Ti vectors. **Trends in plant science**, v. 5, n. 10, p. 446-451, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01740-4](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01740-4).
- HERNÁNDEZ, C.; MATHIS, A.; BROWN, D. J.; BOL, J. F. Sequence of RNA 2 of a nematode-transmissible isolate of tobacco rattle virus. **Journal of General Virology**, v. 76, n. 11, p. 2847-2851, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-11-2847>.
- HERRERA-ESTRELLA, L.; DE BLOCK, M.; MESSENS, E. H. J. P.; HERNALSTEENS, J. P.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. **The EMBO journal**, v. 2, n. 6, p. 987-995, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1983.tb01532.x>.
- HIRIART, J. B.; ARO, E. M.; LEHTO, K. Dynamics of the VIGS-mediated chimeric silencing of the Nicotiana benthamiana ChlH gene and of the tobacco mosaic virus vector. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 16, n. 2, p. 99-106, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1094/mpmi.2003.16.2.99>.
- HUGHES, G.; DAVIES, J. W.; WOOD, K. R. In vitro translation of the bipartite genomic RNA of pea early browning virus. **Journal of general virology**, v. 67, n. 10, p. 2125-2133, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-10-2125>.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323-329, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature05286>.
- JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T.; FIGURNOV, M.; RONNEBERGER, O.; TUNYASUVUNAKOOL, K.; BATES, R.; ŽÍDEK, A.; POTAPENKO, A.; BRIDGLAND, A.; MEYER, C.; KOHL, S. A. A.; BALLARD, A. J.; COWIE, A.; ROMERA-PAREDES, B.; NIKOLOV, S.; JAIN, R.; ADLER, J.; BACK, T.; PETERSEN, S.; REIMAN, D.; CLANCY, E.; ZIELINSKI, M.; STEINEGGER, M.; PACHOLSKA, M.; BERGHAMMER, T.; BODENSTEIN, S.; SILVER, D.; VINYALS, O.; SENIOR, A. W.; KAVUKCUOGLU, K.; KOHLI, P.; HASSABIS, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, London, v. 596, p. 583-589, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- KAUFFMANN, C. M. Pepper ringspot virus: Estudo da resposta imune em Nicotiana benthamiana e utilização como vetor para produção de antígeno específicos contra Coguvírus. 2025. 98 f., il. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade de Brasília (UnB): Instituto de Ciências Biológicas – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Brasília – DF, 2025.
- KAUFFMANN, C. M.; VENDRAMINI, M.; BATISTA, A. M. V.; MOTA, H. B. S.; ANDRADE, I. A.; CÁRDENAS, S. B. S.; QUEIROZ, P. S.; SILVA, B. A.; CORREA, J. R.; NAGATA, T. Specific antibody production using recombinant proteins to elucidate seed transmission and nuclear localization of coguvirus citrulli and coguvirus henanense in radicles of watermelon crop. **Journal of Virological Methods**, v. 325, p. 114886, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2024.114886>.
- KAUR, R.; CHAUHAN, S.; RAJAM, M. V. RNA silencing: the future potential strategy for engineering virus resistance in plants. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 31, n. 8, p. 1271-1291, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12298-025-01659-2>.
- KAWAI, T.; GONOI, A.; NITTA, M.; YAMAGISHI, N.; YOSHIKAWA, N.; TAO, R. Virus-induced gene silencing in various Prunus species with the Apple latent spherical virus vector. **Scientia Horticulturae**, v. 199, p. 103-113, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.031>.
- KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Association of pepper ringspot virus (Brazilian tobacco rattle virus) and host cell mitochondria. **Journal of General Virology**, v. 4, n. 2, p. 177-181, 1969. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-4-2-177>.
- KJEMTRUP, S.; SAMPSON, K. S.; PEELE, C. G.; NGUYEN, L. V.; CONKLING, M. A.; THOMPSON, W. F.; ROBERTSON, D. Gene silencing from plant DNA carried by a Geminivirus. **The Plant Journal**, v. 14, n. 1, p. 91-100, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00101.x>.
- KOKANE, A. D.; LAWRENCE, K.; KOKANE, S. B.; GUBYAD, M. G.; MISRA, P.; REDDY, M. K.; GHOSH, D. K. Development of a SYBR Green-based RT-qPCR assay for the detection of Indian citrus ringspot virus. **3 Biotech**, v. 11, n. 7, p. 359, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02903-8>.
- KONG, X.; YANG, M.; LE, B. H.; HE, W.; HOU, Y. The master role of siRNAs in plant immunity. **Molecular Plant Pathology**, v. 23, n. 10, p. 1565-1574, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.13250>.
- KOONIN, E. V. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. **Journal of General Virology**, v. 72, n. 9, p. 2197-2206, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-9-2197>.
- KUMAGAI, M. H.; DONSON, J.; DELLA-CIOPPA, G.; HARVEY, D.; HANLEY, K.; GRILL, L. K. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. **Proceedings of the National Academy of**

- Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 5, p. 1679-1683, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1679>.
- KUNG, Y. J.; LIN, P. C.; YEH, S. D.; HONG, S. F.; CHUA, N. H.; LIU, L. Y.; LIN, C. P.; HUANG, Y. H.; WU, H. W.; CHEN, C. C.; LIN, S. S. Genetic analyses of the FRNK motif function of Turnip mosaic virus uncover multiple and potentially interactive pathways of cross-protection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, p. 944–955, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-14-0116-R>.
- KUO, R. L.; TAM, E. H.; WOUNG, C. H.; HUNG, C. M.; LIU, H. P.; LIU, H. M.; WU, C. C. Interactome Profiling of N-Terminus-Truncated NS1 Protein of Influenza A Virus Reveals Role of 14-3-3 γ in Virus Replication. **Pathogens**, v. 11, n. 7, p. 733, 2022.
- LECOQ H. Control of plant virus diseases by cross protection. In: HADIDI A., KHATERPAL R.K., KOGANEZAWA H. (eds.), **Plant Virus Disease Control**. St. Paul, Minnesota, APS Press, The American Phytopathological Society: 33–40. 1988.
- LEE, R. F.; BAKER P. S.; ROCHA-PENA M. A. The citrus tristeza virus: An introduction to current priorities with special reference to the worsening situation in central america and the caribbeans. **International Institute of Biological Control**, Ascot, Berks, UK: 197p. 1994.
- LEVIN, R. E. The application of real-time PCR to food and agricultural systems. A review. **Food Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 97-133, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1081/FBT-120030386>.
- LI, C.; YAN, J. M.; LI, Y. Z.; ZHANG, Z. C.; WANG, Q. L.; LIANG, Y. Silencing the SpMPK1, SpMPK2, and SpMPK3 genes in tomato reduces abscisic acid—mediated drought tolerance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 21983-21996, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms141121983>.
- LI, H. L.; GUO, D.; WANG, Y.; ZHU, J. H.; QU, L.; PENG, S. Q. Tobacco rattle virus—induced gene silencing in *Hevea brasiliensis*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 85, n. 3, p. 562-567, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/bbb/zbaa085>.
- LINDBO, J. A. TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. **Plant physiology**, v. 145, n. 4, p. 1232-1240, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.107.106377>.
- LIU, L.; PENG, B.; ZHANG, Z.; WU, Y.; MIRAS, M.; ARANDA, M. A.; GU, Q. Exploring different mutations at a single amino acid position of Cucumber green mottle mosaic virus replicase to attain stable symptom attenuation. **Phytopathology**, v. 107, n. 9, p. 1080-1086, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-17-0107-R>.
- LIU, M.; LIANG, Z.; ARANDA, M. A.; HONG, N.; LIU, L.; KANG, B.; GU, Q. A cucumber green mottle mosaic virus vector for virus-induced gene silencing in cucurbit plants. **Plant Methods**, v. 16, n. 1, p. 9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13007-020-0560-3>.
- LIU, Y.; SCHIFF, M.; MARATHE, R.; DINESH-KUMAR, S. P. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. **The Plant Journal**, v. 30, n. 4, p. 415-429, 2002a. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01297.x>.
- LIU, Y.; SCHIFF, M.; MARATHE, R.; DINESH-KUMAR, S. P. Virus-induced gene silencing in tomato. **The Plant Journal**, v. 31, n. 6, p. 777-786, 2002b. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01394.x>.
- LUKHOVITSKAYA, N. I.; IGNATOVICH, I. V.; SAVENKOV, E. I.; SCHIEMANN, J.; MOROZOV, S. Y.; SOLOVYEV, A. G. Role of the zinc-finger and basic motifs of chrysanthemum virus B p12 protein in nucleic acid binding, protein localization and induction of a hypersensitive response upon expression from a viral vector. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 3, p. 723-733, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.005025-0>.
- LU, R.; MALCUIT, I.; MOFFETT, P.; RUIZ, M. T.; PEART, J.; WU, A. J.; RATHJEN, J. P.; BENDAHDANE, A.; DAY, L.; BAULCOMBE, D.C. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. **The EMBO journal**, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg546>.
- MAAT, D. Z. Pea early-browning virus and tobacco rattle virus — two different, but serologically related viruses. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 69, p. 287-293, 1963. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01995552>.
- MACFARLANE, S. A.; BROWN, D. J.; BOL, J. F. The transmission by nematodes of tobnaviruses is not determined exclusively by the virus coat protein. **European journal of plant pathology**, v. 101, n. 5, p. 535-539, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01874478>.
- MACFARLANE, S. A.; GILMER, D.; DAVIES, J. W. Efficient inoculation with CaMV 35 S promoter-driven DNA clones of the tobnavirus PEBV. **Virology**, v. 187, n. 2, p. 829-831, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90488-B](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90488-B).
- MACFARLANE, S. A. Tobnaviruses—plant pathogens and tools for biotechnology. **Molecular plant pathology**, v. 11, n. 4, p. 577-583, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00617.x>.
- MACFARLANE, S. A.; WALLIS, C. V.; BROWN, D. J. F. Multiple virus genes involved in the nematode transmission of pea early browning virus. **Virology**, v. 219, n. 2, p. 417-422, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0267>.

- MACHADO, P. R. M. S.; JUNIOR, M. P. B.; FONSECA, G. B. L.; MELO, G. E. F.; FREITAS, D. M. S.; NAGATA, T. First report of maize-associated umbra-like virus in maize in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 4, p. 2371-2372, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-025-01997-w>.
- MARTINEZ, J.; TUSCHL, T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. **Genes & development**, v. 18, n. 9, p. 975-980, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.1187904>.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, A. M.; BAULCOMBE, D. C. Tobacco rattle virus 16-kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. **Journal of virology**, v. 82, n. 8, p. 4064-4071, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.02438-07>.
- MATTHEWS, R. E. F. *Plant Virology* (3rd ed.). **Academic Press**. 1991. ISBN 0-12-361160-1.
- MEZIADI, C.; BLANCHET, S.; GEFFROY, V.; PFLIEGER, S. Virus-induced gene silencing (VIGS) and foreign gene expression in *Pisum sativum* L. using the “one-step” Bean pod mottle virus (BPMV) viral vector. In: **Functional Genomics: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2017. p. 311-319. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7231-9_23.
- MCKINNEY H.H. Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. **Journal of Agricultural Research**, 39: 557–578. 1929.
- MOHAMMAD, H.; LAUFER, M.; LIEBE, S.; VARRELMANN, M.; MAISS, E. First description of Beet necrotic yellow vein virus and Beet soil-borne mosaic virus as tools for virus-induced gene silencing. In: MOHAMMAD, H. Construction of a virus-induced gene silencing system based on Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) and Beet soil-borne mosaic virus (BSBMV). 2017. 142 f., il. Tese (Doutorado em Ciências Naturais). Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Hannover – Alemanha, 2017. cap. 4, p. 75–85. DOI: <https://doi.org/10.15488/9028>.
- OFFORD, R. E. Electron microscopic observations on the substructure of tobacco rattle virus. **Journal of Molecular Biology**, Londres, v. 17, n. 2, p. 370-375, 1966. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(66\)80148-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(66)80148-1).
- PALLAS, V.; GARCÍA, J. A. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 2691–2705, 2011. DOI: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.034603-0>.
- PECHINGER, K.; CHOOI, K. M.; MACDIARMID, R. M.; HARPER, S. J.; ZIEBELL, H. A new era for mild strain cross-protection. **Viruses**, v. 11, n. 7, p. 670, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11070670>.
- PFLIEGER, S.; BLANCHET, S.; CAMBORDE, L.; DRUGEON, G.; ROUSSEAU, A.; NOIZET, M.; PLANCHAIS, S.; JUPIN, I. Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis using a ‘one-step’ TYMV-derived vector. **The Plant Journal**, v. 56, n. 4, p. 678-690, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03620.x>.
- PINCZÉS, D.; SÁRAY, R.; NEMES, K.; PALKOVICS, L.; SALÁNKI, K. Viral coat proteins decrease the gene silencing activity of cognate and heterologous viral suppressors. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 31008, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-81998-4>.
- POOJARI, S., ALABI, O. J., OKUBARA, P. A., NAIDU, R. A. SYBR® Green-based real-time quantitative reverse-transcription PCR for detection and discrimination of grapevine viruses. **Journal of virological methods**, v. 235, p. 112-118, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.05.013>.
- QIAO, W.; FALK, B.W. Efficient protein expression and virus-induced gene silencing in plants using a crinivirus-derived vector. **Viruses**, v. 10, n. 5, p. 216, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10050216>.
- QIAO, Y.; XIA, R.; ZHAI, J.; HOU, Y.; FENG, L.; ZHAI, Y.; MA, W. Small RNAs in plant immunity and virulence of filamentous pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 59, n. 1, p. 265-288, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-121520-023514>.
- RAJA, J. A. J.; HUANG, C. H.; CHEN, C.C.; HU, W.C.; CHENG, H.W.; GOH, R. P.; CHAO, C. H.; TAN, Y. R.; YEH, S. D. Modification of the N-terminal FWKG- α H1 element of potyviral HC-Pro affects its multiple functions and generates effective attenuated mutants for cross-protection. **Molecular Plant Pathology**, v. 23, n. 7, p. 947-965, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.13201>.
- RATCLIFF, F.; MARTIN-HERNANDEZ, A. M.; BAULCOMBE, D. C. Technical advance: tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. **The Plant Journal**, v. 25, n. 2, p. 237-245, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2000.00942.x>.
- ROBERTS, C. A.; DIETZGEN, R. G.; HEELAN, L. A.; MACLEAN, D. J. Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. **Journal of Virological Methods**, v. 88, n. 1, p. 1-8, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00156-7](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00156-7).
- ROBINSON, D. J. RNA species of tobacco rattle virus strains and their nucleotide sequence relationships. **Journal of General Virology**, v. 64, n. 3, p. 657-665, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-64-3-657>.
- RODRIGUES, K. B.; ORÍLIO, A. F.; BLAWID, R.; MELO, F. L.; NAGATA, T. Subcellular localization of p29, a putative movement protein of pepper ringspot virus. **Archives of virology**, v. 160, n. 1, p. 359-364, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2237-6>.

- ROISTACHER, C. N. Diagnosis and management of virus and virus like diseases of citrus. In: **Diseases of Fruits and Vegetables Volume I: Diagnosis and Management**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2004. p. 109-189. ISBN: 1-4020-2606-4. 2004.
- RÖSSNER, C.; LOTZ, D.; BECKER, A. VIGS goes viral: how VIGS transforms our understanding of plant science. **Annual Review of Plant Biology**, v. 73, n. 1, p. 703-728, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102820-020542>.
- ROZANOV, M. N.; KOONIN, E. V.; GORBALENYA, A. E. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. **Journal of General Virology**, v. 73, n. 8, p. 2129-2134, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-8-2129>.
- RUIZ-FERRER, V.; VOINNET, O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. **Annual review of plant biology**, v. 60, n. 1, p. 485-510, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant.043008.092111>.
- RUÍZ, M. T.; VOINNET, O.; BAULCOMBE, D. C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. **The Plant Cell**, v. 10, n. 6, p. 937-946, jun. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.10.6.937>.
- RUIZ-RUIZ, S.; AMBRÓS, S.; DEL CARMEN VIVES, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; GUERRI, J. Detection and quantitation of Citrus leaf blotch virus by TaqMan real-time RT-PCR. **Journal of virological methods**, v. 160, n. 1-2, p. 57-62, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.04.012>.
- SACHER, R.; AHLQUIST, P. Effects of deletions in the N-terminal basic arm of brome mosaic virus coat protein on RNA packaging and systemic infection. **Journal of virology**, v. 63, n. 11, p. 4545-4552, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.63.11.4545-4552.1989>.
- SAEDLER, R.; BALDWIN, I. T. Virus-induced gene silencing of jasmonate-induced direct defences, nicotine and trypsin proteinase-inhibitors in *Nicotiana attenuata*. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 395, p. 151-157, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erh004>.
- SAINSBURY, F.; THUENEMANN, E. C.; LOMONOSSOFF, G. P. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. **Plant biotechnology journal**, v. 7, n. 7, p. 682-693, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00434.x>.
- SANAN-MISHRA, N.; CHAKRABORTY, S.; GUPTA, D.; MUKHERJEE, S. K. RNAi suppressors: biology and mechanisms. In: **Plant epigenetics**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 199-230. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-55520-1_11.
- SÄNGER, H. L. Functions of the two particles of tobacco rattle virus. **Journal of Virology**, v.3, n. 3, p. 304-312, 1969. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.3.3.304-312.1969>.
- SANG, S.; LIU, Y.; LI, X.; MA, J.; LIU, X.; YANG, Y. A novel gene silencing strategy based on tobacco rattle virus in *Hibiscus mutabilis*. **PeerJ**, v. 12, p. e18211, 2024. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.18211>.
- SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. **Trends in plant science**, v. 16, n. 12, p. 656-665, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.08.006>.
- SHAH, K. H.; ALMAGHRABI, B.; BOHLMANN, H. Comparison of expression vectors for transient expression of recombinant proteins in plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, n. 6, p. 1529-1538, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11105-013-0614-z>.
- SHERRY, L.; SMITH, M.; DAVIDSON, S.; JACKSON, D. The N terminus of the influenza B virus nucleoprotein is essential for virus viability, nuclear localization, and optimal transcription and replication of the viral genome. **Journal of virology**, v. 88, n. 21, p. 12326-12338, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01542-14>.
- SILBERSCHMIDT, K.; WEIGL, D. R.; SALOMAD, T. A. Some electron microscopic observations on Tobacco cells invaded by the Brazilian Tomato yellow band disease virus. 1970.
- SILVA, B. A.; KAUFFMANN, C. M.; MOTA, H. B. S.; QUEIROZ, P. S.; BATISTA, A. M. V.; CARDENAS, S. B. S.; FREITAS, D. M. S.; NAGATA, T. First report of Moroccan watermelon mosaic virus in pumpkin plants in Brazil. **Plant Disease**, v. 108, n. 2, p. 539, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-23-1536-PDN>.
- SONG, L.; FANG, Y.; CHEN, L.; WANG, J.; CHEN, X. Role of non-coding RNAs in plant immunity. **Plant Communications**, v. 2, n. 3, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100180>.
- TAVARES, M. L. Interação do vírus do anel do pimentão (pepper ringspot virus -PepRSV) com plantas hospedeiras. 2017. 104 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Brasília (UnB): Instituto de Ciências Biológicas – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Brasília – DF, 2017.
- TAVARES-ESASHIKA, M. L. Construção do clone infeccioso e vetor viral de pepper ringspot virus. 2021. 114 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília (UnB): Instituto de Ciências Biológicas – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), Brasília – DF, 2021.
- TAVARES-ESASHIKA, M. L.; CAMPOS, R. N. S.; BLAWID, R.; DA LUZ, L. L.; INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T. Characterization of an infectious clone of pepper ringspot virus and its use as a viral vector. **Archives of Virology**, v. 165, n. 2, p. 367-375, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04505-5>.

- TAVARES-ESASHIKA, M. L.; CAMPOS, R. N. S.; MAEDA, M. H. K.; KOYAMA, L. H. H.; HAMANN, P. R. V.; NORONHA, E. F.; NAGATA, T. Development of a heterologous gene expression vector in plants based on an infectious clone of a tobnavirus, pepper ringspot virus. **Annals of Applied Biology**, v. 181, n. 1, p. 107-116, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/aab.12758>.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Real-time PCR handbook**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/institution/Thermo-Fisher-Scientific/post/Real-Time-PCR-Handbook-6671801c315dc9e5f009ae8d>. Acessado em: 30 de janeiro de 2026.
- TINAZZI, E.; MERLIN, M.; BASON, C.; BERI, R.; ZAMPIERI, R.; LICO, C.; BARTOLONI, E.; PUCCHETTI, A.; LUNARDI, C.; PEZZOTTI, M.; AVESANI, L. Plant-derived chimeric virus particles for the diagnosis of primary Sjögren syndrome. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1080, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01080>.
- TUO, D.; ZHOU, P.; ZHAO, G.; YAN, P.; TAN, D.; LI, X.; SHEN, W. A double mutation in the conserved motifs of the helper component protease of papaya leaf distortion mosaic virus for the generation of a cross-protective attenuated strain. **Phytopathology**, v. 110, n. 1, p. 187-193, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-19-0328-R>.
- UNVER, T.; BUDAK, H. Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method. **International journal of plant genomics**, v. 2009, n. 1, p. 198680, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1155/2009/198680>.
- VAN GRIETHUYSEN, P. A.; REDEKER, K. R.; MACFARLANE, S. A.; NEILSON, R.; HARTLEY, S. E. Virus-induced changes in root volatiles attract soil nematode vectors to infected plants. **New Phytologist**, v. 241, n. 5, p. 2275-2286, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.19518>.
- VARGA, A.; JAMES, D. Detection and differentiation of Plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. **Journal of Virological Methods**, v. 123, n. 2, p. 213-220, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.10.005>.
- VASSILAKOS, N.; VELLIOS, E. K.; BROWN, E. C.; BROWN, D. J. F.; MACFARLANE, S. A. Tobnavirus 2b protein acts in trans to facilitate transmission by nematodes. **Virology**, v. 279, n. 2, p. 478-487, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0677>.
- VENKATARAMAN, S.; KHAN, I.; HABIBI, P.; LE, M.; LIPPERT, R.; HEFFERON, K. Recent advances in expression and purification strategies for plant made vaccines. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1273958, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1273958>.
- VENKATARAMAN, S.; HEFFERON, K. Application of plant viruses in biotechnology, medicine, and human health. **Viruses**, v. 13, n. 9, p. 1697, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13091697>.
- VOINNET, O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, n. 3, p. 206-220, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg1555>.
- VOINNET, Olivier. Three decades of mobile RNA silencing within plants: what have we learnt?. **Journal of Experimental Botany**, v. 77, n. 3, p. 799-817, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/eraf312>.
- WANG, R.; YANG, X.; WANG, N.; LIU, X.; NELSON, R. S.; LI, W.; FAN, Z.; ZHOU, T. An efficient virus-induced gene silencing vector for maize functional genomics research. **The Plant Journal**, v. 86, n. 1, p. 102-115, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/tpj.13142>.
- WASSENEGGER, M.; KRCZAL, G. Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. **Trends in plant science**, v. 11, n. 3, p. 142-151, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.01.003>.
- WRIGHT, P. E.; DYSON, H. J. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 16, n. 1, p. 18-29, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm3920>.
- XU, A.; ZHAO, Z.; CHEN, W.; ZHANG, H.; LIAO, Q.; CHEN, J.; CARR, J. P.; DU, Z. Self-interaction of the cucumber mosaic virus 2b protein plays a vital role in the suppression of RNA silencing and the induction of viral symptoms. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 8, p. 803-812, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12051>.
- XU, X. J.; ZHU, Q.; JIANG, S. Y.; YAN, Z. Y.; GENG, C.; TIAN, Y. P.; LI, X. D. Development and evaluation of stable sugarcane mosaic virus mild mutants for cross-protection against infection by severe strain. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 788963, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.788963>.
- XU, X.; JIANG, S.; LIU, C.; SUN, X.; ZHU, Q.; CHEN, X.; JIANG, P.; WANG, F.; TIAN, Y.; LI, X. Development of a stable attenuated double-mutant of tobacco mosaic virus for cross-protection. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 23, n. 7, p. 2318-2331, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jia.2024.02.019>.
- YAN, D.; HAN, K.; LU, Y.; PENG, J.; RAO, S.; WU, G.; LIU, Y.; CHEN, J.; ZHENG, H.; YAN, F. The nanovirus U2 protein suppresses RNA silencing via three conserved cysteine residues. **Molecular Plant Pathology**, v. 25, n. 1, p. e13394, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.13394>.
- YOON, J. Y.; AHN, H. I.; KIM, M.; TSUDA, S.; RYU, K. H. Pepper mild mottle virus pathogenicity determinants and cross protection effect of attenuated mutants in pepper. **Virus Research**, v. 118, p. 23-30, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.11.004>.

- ZAMBRYSKI, P.; JOOS, H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **The EMBO journal**, v. 2, n. 12, p. 2143-2150, 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80620-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80620-0).
- ZAMORE, P. D.; TUSCHL, T.; SHARP, P. A.; BARTEL, D. P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *cell*, v. 101, n. 1, p. 25-33, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80620-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80620-0).
- ZHANG, X. F.; QU, F. Cross protection of plant viruses: recent developments and mechanistic implications. **Current research topics in plant virology**, p. 241-250, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-32919-2_10.
- ZHANG, Y.; QIU, L.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; FU, C.; DAI, S.; SUN, M. A high-efficiency transient expression system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in *Spinacia oleracea* leaves. **Plant Methods**, v. 20, n. 1, p. 100, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01218-y>.
- ZHOU, P.; PENG, J.; ZENG, M.; WU, L.; FAN, Y.; ZENG, L. Virus-induced gene silencing (VIGS) in Chinese narcissus and its use in functional analysis of NtMYB3. **Horticultural Plant Journal**, v. 7, n. 6, p. 565-572, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2021.04.009>.
- ZHU, M., LIU, S.; WANG, Z.; YU, C.; YUAN, X. A new strategy of cross-protection based on attenuated vaccines: RNA viruses are used as vectors to control DNA viruses. **Agronomy**, v. 13, n. 9, p. 2334, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy13092334>.
- ZIEBELL, H.; CARR, J. P. Cross-protection: a century of mystery. In: **Advances in virus research**. Academic Press, 2010. p. 211-264. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(10\)76006-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(10)76006-1).
- ZIEBELL, H.; MACDIARMID, R. Prospects for engineering and improvement of cross-protective virus strains. **Current Opinion in Virology**, v. 26, p. 8-14, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.06.010>.
- ZULFIQAR, S.; FAROOQ, M. A.; ZHAO, T.; WANG, P.; TABUSAM, J.; WANG, Y.; XUAN, S.; ZHAO, J.; CHEN, X.; SHEN, S.; GU, A. Virus-induced gene silencing (VIGS): a powerful tool for crop improvement and its advancement towards epigenetics. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 6, p. 5608, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24065608>.

APÊNDICE A

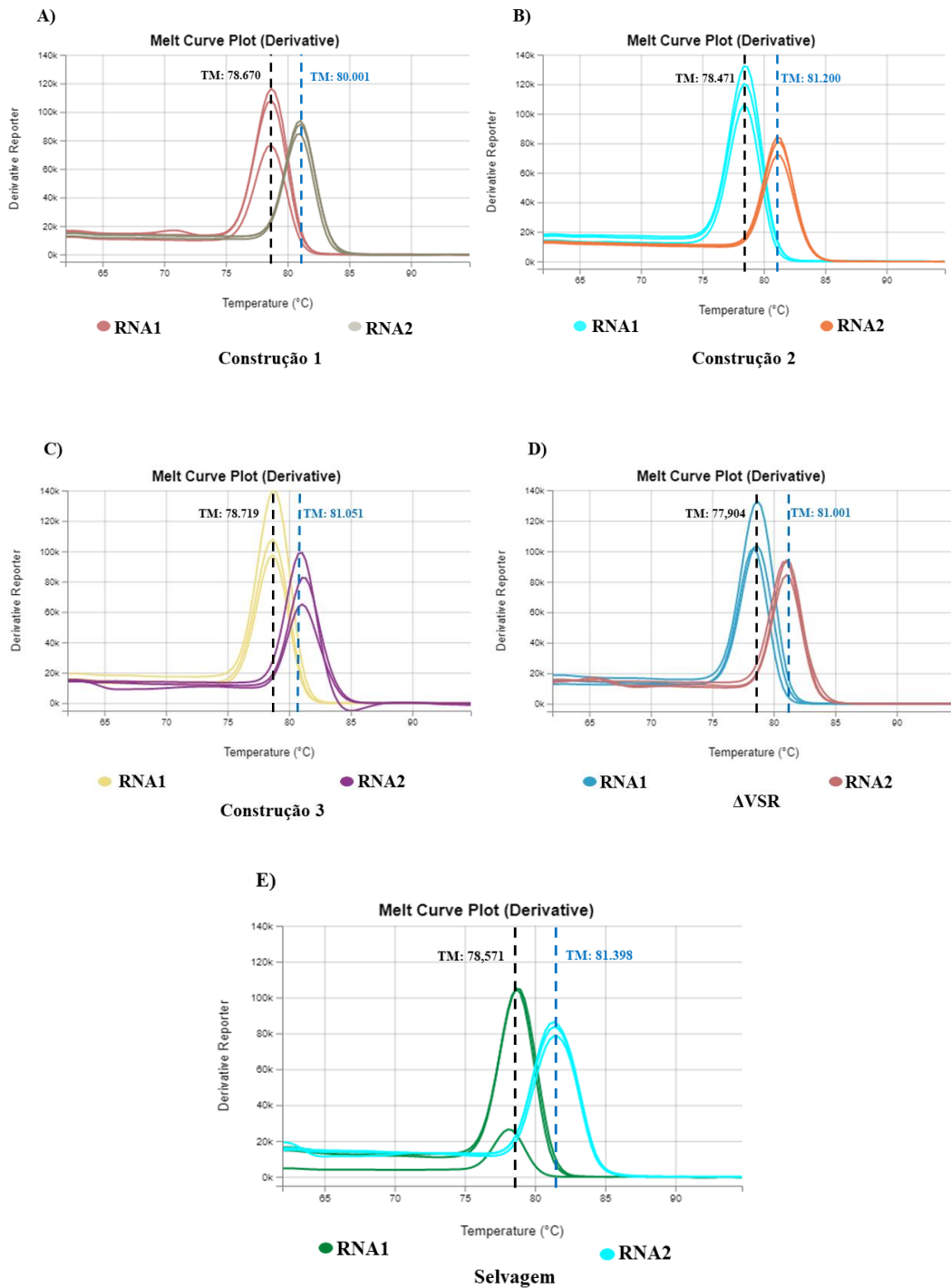


Figura 1. Curvas de dissociação (*melting curve*) com Tm específica para *amplicons* de RNA1 e RNA2 das diferentes construções de RNA1 co-infiltradas com RNA2 do clone 2 de PepRSV.