

**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE, SEGURANÇA
ALIMENTAR E AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO**

**INDUÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO PARA RESISTÊNCIA AO VÍRUS
DA LEPROSE DOS CITROS C, PRINCIPAL AGENTE CAUSAL DA LEPROSE
DOS CITROS**

LAURA ROSSETTO PEREIRA

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre em
Sanidade, Segurança Alimentar e
Ambiental no Agronegócio. Área
de concentração: Segurança
Alimentar e Sanidade Vegetal no
Agroecossistema

SÃO PAULO
2024

LAURA ROSSETTO PEREIRA

**INDUÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO PARA RESISTÊNCIA AO VÍRUS
DA LEPROSE DOS CITROS C, PRINCIPAL AGENTE CAUSAL DA LEPROSE
DOS CITROS**

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre em
Sanidade, Segurança Alimentar e
Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança
Alimentar e Sanidade no
Agroecossistema

Orientadora: Dr^a. Juliana Freitas-
Astúa

Co-orientador: Dr. Pedro Luis
Ramos-González

SÃO PAULO
2024

Eu **Laura Rossetto Pereira**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: 

Data: 12 / 06 / 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Pereira, Laura Rossetto.

Indução do silenciamento gênico para resistência ao vírus da leprose dos citros C, principal agente causal da leprose dos citros. / Laura Rossetto Pereira. - São Paulo, 2024.

100 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2024D.LR02

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Juliana Freitas Astúa

Coorientador: Pedro Luis Ramos González

Versão do título para o inglês: Induction of post-transcriptional gene silencing for resistance against citrus leprosis virus C, the main causal agent of citrus leprosis.

1. Resistência antiviral 2. Transformação genética 3. *Kitaviridae* 4. *Cilevirus* 5. Vírus transmitido por *Brevipalpus* I. Pereira, Laura Rossetto II. Freitas-Astúa, Juliana III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2024/02

O presente trabalho tem autorização pelo Comitê Interno de Biossegurança do Instituto Biológico (CTNBio CQB 120/00) para trabalhar com organismos geneticamente modificados. Antes e após todos os procedimentos foi realizada a limpeza das bancadas com álcool 70% e os materiais plásticos foram devidamente descartados e autoclavados, assim como as placas e os tubos contendo bactérias. As plantas transgênicas foram mantidas em câmara de crescimento Conviron Adaptis 1000 devidamente trancada. Após o desafio com o vírus da leprose dos citros, as plantas foram autoclavadas e descartadas e as sementes produzidas devidamente etiquetadas e guardadas em geladeira com chave.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado (dezembro 2022 – abril 2024, processo 88887.798288/2022-00). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos colaboradores do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CCSM) e Universidade de São Paulo (USP) pelo envio de amostras de laranja doce e ácaros para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus orientadores Juliana e Pedro, pelas oportunidades, constante aprendizado, acompanhamento e paciência para fazer esse projeto se tornar possível.

Aos meus familiares, amigos e colegas, por me apoiarem técnica e emocionalmente ao longo dos últimos anos. O apoio de vocês foi e é essencial sempre.

Às minhas gatas, Suri e Malenia, que nunca vão entender o que faço, mas que me mantem sã e são ótimas companheiras de escrita.

RESUMO

PEREIRA, Laura Rossetto. **Indução do silenciamento gênico para resistência ao vírus da leprose C, principal agente causal da leprose dos citros.** Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2024.

A leprose dos citros (LC) é a principal doença viral que acomete a citricultura brasileira. Embora causada por diversos vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus*, o vírus da leprose dos citros (CiLV-C, *Cilevirus leprosis*) é o agente prevalente no país, transmitido principalmente por *B. yothersi*. Apesar do alto custo, as medidas de controle da LC têm se demonstrado ineficazes devido a interferência com o uso de inseticidas, pouca disponibilidade de diferentes princípios ativos e ocorrência de subpopulações de ácaros *Brevipalpus* resistentes aos acaricidas utilizados. A indução do silenciamento gênico se apresenta como uma alternativa biotecnológica para o controle de doenças virais através da utilização de plantas transgênicas que expressam RNA de fita dupla (dsRNA) com sequências do genoma viral alvo. Nesse estudo, construções genéticas para induzir o silenciamento gênico pós-transcricional (SGpT) contra o CiLV-C foram desenvolvidas como uma alternativa biotecnológica para o controle da LC. Com o intuito de induzir resistência contra os vírus das duas linhagens de CiLV-C encontradas em campo, três regiões com alto perfil de identidade entre as estirpes foram escolhidas como alvo do silenciamento: sequências dos domínios MET e RdRp2 do gene *RdRp* do RNA1 e do gene *p15* do RNA2, da linhagem SJP, uma vez que é a linhagem prevalente no cinturão citrícola. As construções foram desenvolvidas no vetor pHairpin, no qual os fragmentos virais foram inseridos no sentido antisenso e senso, separados por um íntron, que favorece a formação do dsRNA (*hairpin*). As unidades transcricionais 35S-antisenso-íntron-senso-tNos foram inseridas no vetor binário pCAMBIA2300 e posteriormente transformadas em *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Trinta e oito linhas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas foram obtidas mediante a transformação por *floral dip* (eficiência de transformação 0,07%-0,49%). Seis plantas T₁ de treze linhagens foram infestadas com ácaros *B. yothersi* virulíferos para CiLV-C estirpe SJP. Após 12 dias, a carga viral nas folhas infestadas foi avaliada por RT-qPCR com sondas de hidrólise específicas para o gene *RdRp* viral. Em seis linhas transgênicas (três RdRp-hp, uma MET-

hp e duas p15-hp) evidenciou-se redução na carga viral de 94,5-100% ($p < 0,05$), em quatro linhas (uma RdRp, duas MET-hp e uma p15-hp) de 61-76,7% e em duas linhas p15-hp as cargas virais foram menos drasticamente reduzidas (35,8% e 14,4%) com relação às observadas nas plantas selvagens. Um único evento transgênico (p15-hp) apresentou aumento de 16% no acúmulo viral quando comparado com plantas não transformadas, no entanto não houve diferença estatística deste evento com as plantas selvagens. Os resultados em arábido, hospedeira experimental tanto do vírus quanto do vetor, confirmam que a abordagem da indução do SGpT contra o CiLV-C é viável para o controle da infecção por esse kitavírus.

Palavras-chave: transformação genética, vírus transmitido por *Brevipalpus*, *Cilevirus*, resistência antiviral, *Kitaviridae*

ABSTRACT

PEREIRA, Laura Rossetto. **Induction of post-transcriptional gene silencing for resistance against citrus leprosis virus C, the main causal agent of citrus leprosis.**

Thesis (Masters in Plant and Animal Health, Food and Environmental Safety in the Agribusiness) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2023.

Citrus leprosis (CL) is the main viral disease that affects Brazilian citriculture. Although it is caused by several viruses transmitted by mites of the genus *Brevipalpus*, citrus leprosis virus C (CiLV-C, *Cilevirus leprosis*), transmitted mainly by *B. yothersi*, is the most relevant and predominant causal agent of CL in the country. Despite its high cost, the control measures of CL have become ineffective due to interference with the use of insecticides, availability of only a few different active ingredients, and the occurrence of subpopulations of *Brevipalpus* mites resistant to the acaricides used. The induction of gene silencing is a biotechnological alternative for the control of plant viruses through the development of transgenic plants that express double-stranded RNA (dsRNA) with sequences of the viral genome target. Aiming to explore this alternative against the two CiLV-C strains found in commercial orchards, three regions with a high identity profile between the strains were chosen as targets for silencing: sequences from the MET and RdRp2 domains of the *RdRp* gene of RNA1 and from the *p15* gene of RNA2, from the SJP strain, as it is the prevalent one in the Brazilian citrus belt. The constructs were assembled in the pHairpin vector, in which the viral fragments were inserted in the sense and antisense orientation, separated by an intron, which favors the formation of dsRNA. The 35S-antisense-intron-sense-tNos transcriptional units were inserted into the pCAMBIA2300 binary vector and subsequently transformed into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Through floral dip, a total of thirty-eight transgenic arabidopsis plants were obtained (transformation efficiency of 0.07%- 0.49%). Six T₁ plants from thirteen transgenic lines were challenged with viruliferous *B. yothersi* mites infected with CiLV-C strain SJP for twelve days. The infested leaves were evaluated through RT-qPCR to determine their viral accumulation with hydrolysis probes detecting the *RdRp* gene. Statistical analyzes ($p < 0.05$) showed a reduction in viral accumulation of 94-100% in six transgenic lines (three RdRp2-hp, one MET-hp and two p15-hp), 61-76.6% in four lines (one RdRp2-hp, two MET-hp and one p15-hp) and 14.4-35.8% in two p15-hp lines

compared to the wild type plants. Only one transgenic event (p15-hp) exhibited an increase in viral accumulation of 16% compared to the wild type, although there was no statistical difference between them. Therefore, the induction of PTGS against CiLV-C is viable for controlling CL, at least in its experimental host.

Keywords: genetic transformation, *Brevipalpus*-transmitted viruses, *Cilevirus*, antiviral resistance, *Kitaviridae*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** **A.** Lesões anelares cloróticas e necróticas em folhas, frutos e ramos de laranja doce (*Citrus x sinensis* (L.) Osbeck), típicos da leprose dos citros causada pelo vírus da leprose dos citros C (CiLV-C, sigla do nome em inglês, *Cilevirus leprosis*). Fotos: arquivo pessoal. **B.** Microscopia eletrônica de varredura de *Brevipalpus yothersi*, vetor do CiLV-C (Foto: Tassi et al., 2017). 20
- Figura 2:** **A.** Representação linear de alguns elementos do plasmídeo pHairpin. A unidade transcricional de interesse contém o promotor 35S do CaMV, íntron da catalase de folha de batata, tNos e os fragmentos virais no sentido antisenso e senso. Apenas as enzimas relevantes para a clonagem dos fragmentos virais no sentido antisenso e senso estão indicadas. **B.** Fluxograma das etapas realizadas para a montagem das construções genéticas no vetor pHairpin e pCAMBIA2300. **C.** Representação linear da região do DNA de transferência (T-DNA) do vetor binário pCAMBIA2300 contendo as unidades transcricionais com os fragmentos virais inseridos e que confere resistência ao antibiótico canamicina (gene *nptII*). LB: borda esquerda; 35S polyA: sinal de poliadenilação do 35S; gene *nptII*; CaMV 35S: promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor. Segunda unidade transcricional contendo o promotor 35S, fragmento viral antisenso (derivado do CiLV-C), íntron da catalase da folha de batata, fragmento viral senso (derivado do CiLV-C) e tNos. RB: borda direita. Apenas as enzimas utilizadas para a confirmação da construção estão indicadas. O tamanho de cada gene não condiz com a escala real. 38
- Figura 3:** Botões florais de *Arabidopsis thaliana*. O estágio pré-abertura (fechados) é considerado o momento ideal para a realização do *floral dip*. 40
- Figura 4:** Desenvolvimento das lesões causadas pela infecção por CiLV-C em *A. thaliana* e escala diagramática de notas utilizada nas avaliações dos sintomas durante o desafio das plantas com CiLV-C. Os graus de lesões incluem o nível 1: manchas amareladas ao redor de 1 mm; nível 2: manchas amarelas de 0,5-1 cm com outros pontos de sintomas na folha; nível 3: manchas amarelas acima de 1cm. com manchas cloróticas ao redor; e nível 4: folhas senescentes com pontos verdes espalhados e começo de necrose em alguns pontos. 47
- Figura 5:** Análise do perfil de identidade entre as estirpes SJP, CRD e ASU de CiLV-C. Traços vermelhos indicam a posição das sequências escolhidas como alvo do silenciamento gênico. **A.** Representação linear do RNA1 de CiLV-C, mostrando as posições dos genes *RdRp* e *p29*. Acima estão indicados os domínios do gene *RdRp*. **B.** Perfil de identidade do RNA1 de SJP (KP336746) com aqueles das estirpes CRD (NC008169) e ASU (MT554532). **C.** Representação linear do RNA2 de CiLV-C, mostrando as posições dos genes *p15*, *p61*, *p32* e *p24*. **D.** Perfil de identidade do RNA2 de SJP (KP336747) com os das estirpes CRD (NC008170) e ASU (MT554546). As plotagens foram realizadas utilizando o programa Simplot versão 3.5.1. 50
- Figura 6:** Géis de agarose (1%) com os perfis de restrição das construções genéticas para a indução do silenciamento gênico contra o CiLV-C. Os plasmídeos foram incubados com uma combinação de enzimas de restrição. As construções finais foram montadas com o vetor binário pCAMBIA2300. MM - Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). **A.** Digestão dupla dos plasmídeos recombinantes com *HindIII* e *BamHI*. **B.** Digestão das construções finais com *PstI*. 51
- Figura 7:** Análise *in silico* do fragmento RdRp2-hp de CiLV-C pelo programa si-Fi (siRNA-Finder) (Lück et al., 2019). Na coluna Alvo está indicado o número de acesso da

sequência em análise. **A.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA1 da estirpe SJP. **B.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA1 da estirpe CRD. **C.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA1 da estirpe ASU. 52

Figura 8: Análise *in silico* do fragmento RdRp2 de CiLV-C pelo programa si-Fi (siRNA-Finder) contra o genoma de *B. yothersi*..... 53

Figura 9: Seleção de eventos transgênicos de RdRp2-hp através da germinação de sementes de *A. thaliana* em meio MS (Murashie e Skoog, MES e ágar (0,8%) com canamicina (50 mg/mL). Uma região da placa evidenciando a diferença entre plantas resistentes e sensíveis ao antibiótico foi destacada. Cerca de 200 sementes foram semeadas por placa de seleção..... 54

Figura 10: Géis de agarose (0,8%) mostrando a análise feita por PCR das plantas resistentes ao antibiótico canamicina. MM: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). Números anotados em cima do gel indicam a identificação de cada linhagem transgênica. Cada planta foi analisada em duplicata. WT: arábidoopsis selvagem (controle negativo). B: branco da PCR. C+: plasmídeo pCAMBIA2300 com os fragmentos virais de cada construção. **A.** PCR realizada com iniciadores para amplificação de um fragmento do gene RdRp2-hp de 567 pb. **B.** PCR realizada com iniciadores para amplificação de um fragmento do gene MET-hp de 323 pb. **C.** PCR realizada com iniciadores para amplificação de um fragmento do gene p15-hp de 370 pb. 55

Figura 11: Géis de agarose (0,8%) de ensaios de PCR feitos com iniciadores que amplificam um fragmento de 798 pb do gene *nptII* das diversas construções avaliadas. MM: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). WT: arábidoopsis selvagem (controle negativo). B: branco da PCR. C+: controle positivo (plasmídeo pCAMBIA2300). 56

Figura 12: Germinação de sementes da geração T₁ da planta RdRp2-hp_12 em meio MS com canamicina (50 mg/mL). As setas indicam uma planta resistente ao antibiótico (folhas verdadeiras e verdes) e uma planta sensível não transgênica (plântulas amareladas, sem ou com pouco desenvolvimento das folhas verdadeiras). 57

Figura 13: Curva padrão elaborada com os valores de C_q das linhagens transgênicas avaliadas. **A e B.** Curvas padrões para RdRp2 e 4HPPD (gene de referência de *A. thaliana*) da linhagem RdRp2-hp_70. **C e D.** Curvas padrões para RdRp2 e 4HPPD da linhagem RdRp2-hp_92. As curvas foram obtidas a partir da diluição seriada do DNA genômico extraído das plantas (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg e 1 pg). Y = valor de intercessão. R² = coeficiente de determinação. E = eficiência de amplificação..... 59

Figura 14: Gel de agarose (0,8%) dos resultados da RT-PCR realizada para detecção de CiLV-C SJP em *B. yothersi* virulíferos. **A.** Iniciadores que amplificam uma região de 456 pb do gene *p29* do RNA1. **B.** Iniciadores que amplificam uma região de 393 pb do gene *p24* do RNA2. MM: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). 1-26: ácaros virulíferos (10 ácaros por fruto). C-: controle negativo (*B. yothersi* avirulífero). Bc: branco da síntese de cDNA. B: branco da PCR. C+: controle positivo (fruto de laranja doce infectado com CiLV-C SJP)..... 60

Figura 15: Análise do ensaio piloto em *A. thaliana* selvagem infestadas com ácaros *Brevipalpus yothersi* virulíferos para verificação da eficiência de inoculação. **A.** Folhas de arábidoopsis com sintomas na forma de manchas cloróticas e necróticas. **B.** Gel de agarose (0,8%) da RT-PCR realizada com iniciadores que amplificam um fragmento de

456 pb do gene *p29* do CiLV-C SJP. MM: Marcador molecular 1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). 1-12: amostras de arábido (folhas infestadas com ácaros virulíferos). Bc: branco do cDNA. B: branco da PCR. C+: controle positivo (fruto de laranja doce com CiLV-C SJP)..... 61

Figura 16: Desenvolvimento dos sintomas após a infestação com ácaros virulíferos das plantas transgênicas e selvagens durante os desafios com CiLV-C. Os gráficos mostram a dispersão da severidade de acordo com uma escala diagramática de notas ao longo do desafio. A linha azul representa a curva de tendência e próximo a ela o valor do seu declive. A linha em análise está indicada no título de cada gráfico. Eixo x: dias após infestação. Eixo y: Severidade dos sintomas. Cada ponto preto representa uma folha. **A.** Primeiro desafio. **B.** Segundo desafio. **C.** Terceiro desafio. **D.** Quarto desafio..... 63

Figura 17: Carga viral de CiLV-C após o desafio das linhagens de plantas transgênicas e selvagens de *A. thaliana*. O genoma viral foi detectado mediante RT-qPCR. Outliers foram removidos dos gráficos para melhor visualização da distribuição dos dados, mas foram incluídos nas análises estatísticas. Diferenças estatísticas foram avaliadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis e Dunn, comparando os dados de cada grupo por experimento e são indicadas por diferentes letras ($p < 0.05$). **A.** Primeiro desafio. **B.** Segundo desafio. **C.** Terceiro desafio. **D.** Quarto desafio. As linhagens analisadas em cada desafio estão indicadas no eixo x dos gráficos. 65

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES

Figura complementar 1: **A.** Representação de alguns elementos do plasmídeo *pHairpin*. A unidade transcricional de interesse contém: promotor 35S do CaMV, íntron da catalase de folha de batata, tNos, os fragmentos virais no sentido antisenso e senso e o gene para resistência ao antibiótico ampicilina. Apenas as enzimas relevantes para a clonagem dos fragmentos virais nos sentidos antisenso e senso estão indicadas. **B.** Representação de alguns elementos do vetor binário pCAMBIA2300 contendo as unidades transcricionais com os fragmentos virais inseridos e que confere resistência ao antibiótico canamicina (gene *nptII*). RB: borda direita. Primeira unidade transcricional contém o promotor 35S, fragmento viral derivado de CiLV-C antisenso, íntron da catalase da folha de batata, fragmento viral de CiLV-C senso e tNos. LB: borda esquerda. Segunda unidade transcricional contendo promotor 35S, gene *nptII* e 35S PolyA (sinal de poliadenilação do 35S). Apenas as enzimas utilizadas para a confirmação da construção estão indicadas. O tamanho de cada gene não condiz com a escala real. 94

Figura complementar 2: Análise *in silico* do fragmento MET-hp de CiLV-C pelo programa si-Fi (siRNA-Finder) (Lück et al., 2019). Na coluna Alvo está indicado o número de acesso da sequência em análise. **A.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA1 da estirpe SJP. **B.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA1 da estirpe CRD. **C.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA1 da estirpe ASU..... 95

Figura complementar 3: Análise *in silico* do fragmento p15-hp de CiLV-C pelo programa si-Fi (siRNA-Finder) (Lück et al., 2019). Na coluna Alvo está indicado o número de acesso da sequência em análise. **A.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA2 da estirpe SJP. **B.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA2 da estirpe CRD. **C.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA2 da estirpe ASU..... 96

Figura suplementar 4: Géis de agarose (0,8%) evidenciando os resultados da PCR realizada para a avaliação das plantas RdRp-hp utilizando iniciadores para a amplificação de um fragmento do gene RdRp2-hp de 567 pb. MM: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). Números na parte superior dos géis indicam a identificação de cada linhagem transgênica. Cada planta foi analisada em duplicata. WT: arábidoopsis selvagem (controle negativo). B: branco da PCR. C+: plasmídeo pCAMBIA2300/RdRp-hp.	97
Figura suplementar 5: Géis de agarose (0,8%) evidenciando os resultados da PCR realizada para a avaliação das plantas MET-hp. Iniciadores para amplificação de um fragmento de 323 pb do gene MET-hp foram utilizados. MM: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). Números anotados na parte superior dos géis indicam a identificação de cada linhagem transgênica. Cada planta foi analisada em duplicata WT: arábidoopsis selvagem (controle negativo). B: branco da PCR. C+: plasmídeo pCAMBIA2300/MET-hp.	97
Figura suplementar 6: Gel de agarose (0,8%) evidenciando os resultados da PCR das plantas p15-hp com os iniciadores para amplificação de um fragmento do gene p15-hp de 370 pb. MM: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). Números anotados na parte superior do gel indicam a identificação de cada linhagem transgênica. Cada planta foi analisada em duplicata. WT: arábidoopsis selvagem (controle negativo). B: branco da PCR. C+: plasmídeo pCAMBIA2300/p15-hp.	98
Figura suplementar 7: Gel de agarose (0,8%) demonstrando os resultados da PCR feita para análise das linhagens transgênicas com iniciadores para detecção do gene <i>tzs</i> de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101, que amplifica um fragmento de 664 pb. MM: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). B: branco da PCR. C+: controle positivo (colônia isolada de <i>A. tumefaciens</i>).	98
Figura suplementar 8: Análises realizadas com diferentes tipos de amostra para determinar qual par de iniciadores é o mais adequado para a amplificação do gene <i>SAND</i> com fluoróforos intercalantes para utilização como normalizador. Os dois pares de iniciadores foram desenhados em junções éxon-éxon. A. Análise dos iniciadores para o gene <i>SAND</i> (Hong et al., 2010). B. Análise dos iniciadores para o gene <i>SAND</i> (Beatrice et al., 2022).	99
Figura suplementar 9: Curva padrão elaborada para os iniciadores para o gene <i>SAND</i> com os valores de Cq obtido com uma diluição seriada a partir de 60 ng/uL de cDNA de folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i> sadia. Y = valor de intercessão. R ² = coeficiente de determinação. E = eficiência de amplificação.	99
Figura suplementar 10: Sintomas nas plantas transgênicas e selvagens de cada experimento conduzido no trabalho. Apenas 3 folhas foram escolhidas para representar cada linhagem por experimento. A. Primeiro desafio. B. Segundo desafio. C. Terceiro desafio. D. Quarto desafio.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores desenhados para a amplificação das regiões genômicas de CiLV-C SJP escolhidas como alvo do silenciamento gênico: RdRp2, MET e p15. Sítios de restrição convenientemente adicionados ao iniciador estão marcados em negrito e sublinhado. pb: pares de bases.....	34
Tabela 2: Iniciadores utilizados para a análise molecular por PCR das plantas recombinantes.....	42
Tabela 3: Iniciadores utilizados para a verificação do número de cópias dos transgenes por PCR em tempo real com fluoróforos intercalantes. T _m = temperatura de melting.	44
Tabela 4: Iniciadores e sonda utilizados nas análises por PCR quantitativo da acumulação viral após o desafio das plantas transgênicas.	49
Tabela 5: Tabela de contingência elaborada para análise da segregação mendeliana nas plantas transgênicas da geração T ₁	57

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela suplementar 1: Predição de alvos não específicos do fragmento MET-hp de CiLV-C em <i>Arabidopsis thaliana</i> pela ferramenta dsCheck. Mis: mismatch (incompatibilidade de nucleotídeos).....	90
Tabela suplementar 2: Predição de alvos não específicos do fragmento RdRp2-hp de CiLV-C em <i>Arabidopsis thaliana</i> pela ferramenta dsCheck. Mis: mismatch (incompatibilidade de nucleotídeos).....	91
Tabela suplementar 3: Predição de alvos não específicos do fragmento p15-hp de CiLV-C em <i>Arabidopsis thaliana</i> pela ferramenta dsCheck. Mis: mismatch (incompatibilidade de nucleotídeos).....	92
Tabela suplementar 4: Resultados obtidos por qPCR demonstrando a carga viral nas plantas selvagens e transgênicas após o desafio com ácaros virulíferos para CiLV-C SJP.	93

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	Cultura de laranja doce (<i>Citrus x sinensis</i>) no Brasil.....	19
2.2	Histórico e impacto da leprose dos citros na citricultura no Brasil.....	20
2.3	Vírus transmitidos por ácaros do gênero <i>Brevipalpus</i> causadores da leprose dos citros	21
2.4	CiLV-C e a epidemiologia da leprose dos citros.....	22
2.5	Ácaros do gênero <i>Brevipalpus</i> e o controle da leprose dos citros.....	23
2.6	Alternativas para o controle de doenças virais em citros, com foco na leprose dos citros.....	25
2.6.1	Melhoramento genético tradicional.....	25
2.6.2	Controle biológico de <i>Brevipalpus</i> spp.	26
2.6.3	Proteção cruzada.....	26
2.6.4	Edição gênica.....	27
2.7	Silenciamento gênico pós-transcricional e sua aplicação em campo.....	28
2.7.1	Citrus resistentes a infecções virais pela indução do silenciamento gênico	31
2.8	Transformação genética de <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
3	OBJETIVO GERAL.....	32
3.1	Objetivos específicos.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Escolha das regiões alvos no genoma de CiLV-C para as construções de indução do silenciamento gênico.....	33
4.2	Análise <i>in silico</i> dos fragmentos escolhidos para indução do silenciamento gênico	34
4.3	Materiais vegetais utilizados.....	35
4.4	Extração de RNA total de amostras vegetais e síntese de DNA complementar	36
4.5	Reação em cadeia da polimerase (PCR) e gel de agarose.....	36
4.6	Desenvolvimento das construções genéticas para expressão de hpRNA viral em plantas transgênicas.....	37
4.7	Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101.....	39
4.8	Transformação genética de <i>A. thaliana</i> por <i>floral dip</i> e seleção das linhagens transformadas.....	40
4.9	Análise molecular das plantas recombinantes.....	41

4.10	Determinação do número de cópias dos transgenes mediante análises fenotípicas.....	42
4.11	Determinação do número de cópias dos transgene mediante qPCR.....	43
4.12	Criação e manutenção de ácaros <i>Brevipalpus yothersi</i> virulíferos	44
4.13	Ensaio piloto para a avaliação da eficiência de inoculação de CiLV-C por ácaros <i>Brevipalpus yothersi</i>	45
4.14	Desafio das plantas transgênicas com CiLV-C.....	45
4.15	Avaliação da acumulação viral após o desafio.....	47
4.15.1	Extração de RNA total livre de DNA e síntese de cDNA.....	47
4.15.2	Análise da acumulação viral por qPCR.....	48
4.16	Análise estatística.....	49
5	RESULTADOS	50
5.1	Construções genéticas para a indução do silenciamento gênico contra o CiLV-C em <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
5.2	Eficiência teórica e identificação de alvos dos siRNAs derivados dos fragmentos virais nas construções genéticas para a indução do silenciamento.....	51
5.3	Linhagens transgênicas obtidas através do <i>floral dip</i>	53
5.4	Segregação mendeliana dos transgenes e quantificação do número de cópias na geração T ₁ mediante avaliação do desenvolvimento das plântulas em meio de seleção	56
5.5	Quantificação do número de cópias dos transgene na geração T ₁ mediante PCR quantitativo	59
5.6	Estabelecimento de experimentos pilotos para o desafio das plantas transgênicas	60
5.7	Redução da carga viral nas plantas transgênicas inoculadas com CiLV-C	61
6	DISCUSSÃO.....	65
7	CONCLUSÕES.....	74
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
9	TABELAS SUPLEMENTARES	90
10	FIGURAS SUPLEMENTARES	94

1 INTRODUÇÃO

O Brasil lidera o ranking mundial de produção de laranja doce (*Citrus x sinensis* (L.) Osbeck) e é responsável por $\frac{3}{4}$ da exportação mundial de suco de laranja (Foreign Agriculture Service/EUA, 2024). Em 2022, aproximadamente 17 milhões de toneladas da fruta foram colhidas no país (IBGE, 2022), principalmente nos 400 mil hectares do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro (SP-MG). No cinturão citrícola, a safra de 2023/24 foi encerrada com 307,22 milhões de caixas de 40,8 kg de laranja produzidas (FUNDECITRUS, 2024). Além de condições climáticas adversas cada vez mais frequentes, como longos períodos de estiagem e altas temperaturas, a produtividade da agroindústria citrícola é ameaçada por pragas e doenças que colocam em risco a sua sustentabilidade.

A Leprose dos Citros (LC) é a principal doença de etiologia viral que afeta a citricultura brasileira (Bassanezi et al., 2019; Ramos-González et al., 2018). A doença está distribuída por todo o território nacional e em diversos países da América Latina e na África do Sul (Bastianel et al., 2010; Cook et al., 2019; Freitas-Astúa et al., 2018). A LC é evidente nos ramos, folhas e frutos na forma de lesões circulares cloróticas e/ou necróticas, que podem levar à queda prematura de folhas e frutos, o que compromete a produção e até a vida útil das plantas, e à depreciação dos frutos (Moreira et al., 2022).

A doença é causada por diversos vírus que pertencem a um grupo comumente conhecido como vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* (VTBs) (Freitas-Astúa et al., 2018). Do ponto de vista taxonômico, os VTBs são classificados em três gêneros: *Dichorhavirus*, da família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*, (Dietzgen et al., 2018) e *Cilevirus* e *Higrevirus*, ambos da família *Kitaviridae*, ordem *Martellivirales* (Olmedo Velarde et al., 2023; Quito-Avila et al., 2021; Ramos-González et al., 2023; Rodrigues, 2022).

Embora a LC seja produzida por diversos VTBs, o vírus da leprose dos citros C (CiLV-C, sigla do nome em inglês, *Cilevirus leprosis*), transmitido por *B. yothersi* e *B. papayensis* (Nunes et al., 2018; Ramos-González et al., 2016) é o principal agente etiológico da doença na América Latina e é amplamente distribuído no Brasil (Chabi-Jesus et al., 2021). O CiLV-C é o vírus com maior amplitude geográfica dentre os cilevírus e sua população está subdividida em três linhagens. Os vírus dessas três linhagens apresentam cerca de 85% de identidade nucleotídica e diferentes características de dispersão geográfica (Chabi-Jesus et al., 2021; Ramos-González et al., 2016). Os vírus

da linhagem CRD foram encontrados pela primeira vez em Cordeirópolis, SP (Localifabris et al., 2006) e os vírus da linhagem SJP foram detectados inicialmente em São José do Rio Preto, SP (Ramos-González et al., 2016). A linhagem ASU foi caracterizada a partir de uma única amostra herborizada coletada em 1937 na cidade de Assunção, Paraguai (Chabi-Jesus et al., 2021). Até o momento, não foram encontrados vírus dessa linhagem em amostras de campo. Os isolados da linhagem CRD estão amplamente distribuídos em pomares comerciais e não comerciais de citros pela América Latina enquanto os isolados da linhagem SJP são prevalentes nas áreas comerciais do cinturão citrícola de São Paulo e do triângulo mineiro (Chabi-Jesus et al., 2021).

O manejo da LC tem se tornado uma grande preocupação, sobretudo para a região do cinturão citrícola brasileiro, que é a maior região produtora de laranja do mundo (Moreira et al., 2022). Embora existam diversas práticas culturais sugeridas para o seu manejo, o controle da doença é feito quase que exclusivamente pela aplicação de acaricidas (Bassanezi et al., 2019). O controle químico dos ácaros *Brevipalpus* no cinturão citrícola de São Paulo e no triângulo mineiro custa em média US\$ 54 milhões/ano (Bassanezi et al., 2019). A escassa disponibilidade de princípios ativos dificulta o programa de rotação de acaricidas cujo principal objetivo é evitar a seleção de populações resistentes (Bassanezi, 2018; Moreira et al., 2022; Vechia et al., 2022). A identificação de subpopulações de *Brevipalpus* resistentes a diferentes acaricidas já foi relatada (Campos & Omoto, 2002; Franco et al., 2007; Rocha et al., 2021). O controle através de acaricidas apresenta outra dificuldade: a mistura de acaricidas e inseticidas no mesmo tanque de pulverização pode diminuir a eficácia dos acaricidas (Della Vechia et al., 2018, 2019, 2023). Assim, os métodos utilizados para o manejo da LC através do controle do ácaro vetor têm se tornado inviáveis, demonstrando a importância de investigar outras abordagens.

Uma alternativa para o controle de fitovírus é através da expressão transgênica de fragmentos virais que induzem mecanismos de defesa da planta, como o silenciamento gênico (Taliensky et al., 2021). Além de ser um mecanismo de controle da expressão gênica, o silenciamento gênico pós-transcricional funciona como a principal arma da resposta antiviral em plantas (Yang & Li, 2018). A endonuclease Dicer reconhece RNA de fita dupla (dsRNA, do termo em inglês *double stranded RNA*) e, a partir dele, produz RNA de pequeno tamanho interferente (siRNA). A proteína Argonata se associa ao siRNA, formando o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, sigla do termo

em inglês). O complexo tem como alvo o mRNA complementar ao RNA guia (uma das fitas do siRNA que permanece no complexo) e intermedeia a degradação de maneira pós-transcricional do RNA viral ou pode inibir a tradução de genes endógenos (regulação da expressão gênica mediante microRNA) (Jin et al., 2022).

As estratégias baseadas na indução do silenciamento gênico pós-transcricional (SGpT) para o controle da replicação de vírus podem ser implementadas mediante a produção de plantas transgênicas. A planta pode pré-estabelecer uma barreira contra a infecção viral produzindo siRNA derivados do dsRNA expressado de forma ectópica e induzir a degradação de genes virais ou, ainda, de fatores de suscetibilidade da própria planta (Deng et al., 2022). No entanto, a eficiência da estratégia de indução de SGpT para a redução ou inibição da infecção viral depende da região do genoma viral que será utilizada como alvo do silenciamento (Akbarimotlagh et al., 2023; Mohamed et al., 2022).

Com o intuito de explorar o potencial da indução do silenciamento gênico como uma alternativa para o controle da leprose dos citros, este trabalho visa avaliar a expressão de moléculas de RNA do tipo *hairpin* (hpRNA) contendo diferentes fragmentos do genoma de CiLV-C em *Arabidopsis thaliana* transgênica para a análise da resistência induzida.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura de laranja doce (*Citrus x sinensis*) no Brasil

O Brasil é o maior produtor de laranja doce e exportador de suco de laranja concentrado do mundo (Foreign Agriculture Service/EUA, 2024). A produção total da safra de 2023/24 foi de 307,22 milhões de caixas (FUNDECITRUS, 2024) e apenas o cinturão citrícola (região centro-norte de São Paulo e triângulo mineiro) é responsável por mais de 60% da produção brasileira. Ainda assim, os pomares nacionais são negativamente impactados por inúmeros fatores bióticos e abióticos que reduzem a qualidade e a produção dos frutos. A safra de 2022/23 teve uma das maiores taxas de queda prematura de frutos já registrada, aproximadamente 20% em mais de dez variedades de laranjas diferentes (Fundecitrus, 2023). Condições climáticas adversas, danos causados por máquinas, e pragas e doenças estão entre as principais causas desse problema.

2.2 Histórico e impacto da leprose dos citros na citricultura no Brasil

A leprose dos citros (LC) destaca-se como a principal doença de etiologia viral que acomete a citricultura nacional (Bassanezi et al., 2019; Ramos-González et al., 2018). A doença foi relatada pela primeira vez na Flórida, EUA, em 1907 (Fawcett, 1911) e identificada no Brasil em 1931, em São Paulo (Bitancourt, 1934). A LC encontra-se amplamente disseminada pelo território nacional, além de estar presente em vários países da América Latina e na África do Sul (Bastianel et al., 2010; Cook et al., 2019; Freitas-Astúa et al., 2018). Seus sintomas são evidentes nos ramos, folhas e frutos na forma de lesões localizadas circulares cloróticas e/ou necróticas (Fig. 1A), que causam redução do valor comercial dos frutos e podem levar à queda prematura de folhas e frutos, comprometendo a produção e a vida útil das plantas (Moreira et al., 2022). Em 2004, um dos períodos mais críticos da doença, mais de 50% das laranjeiras dos pomares comerciais do estado de São Paulo apresentavam sintomas da LC (Bassanezi, 2004).

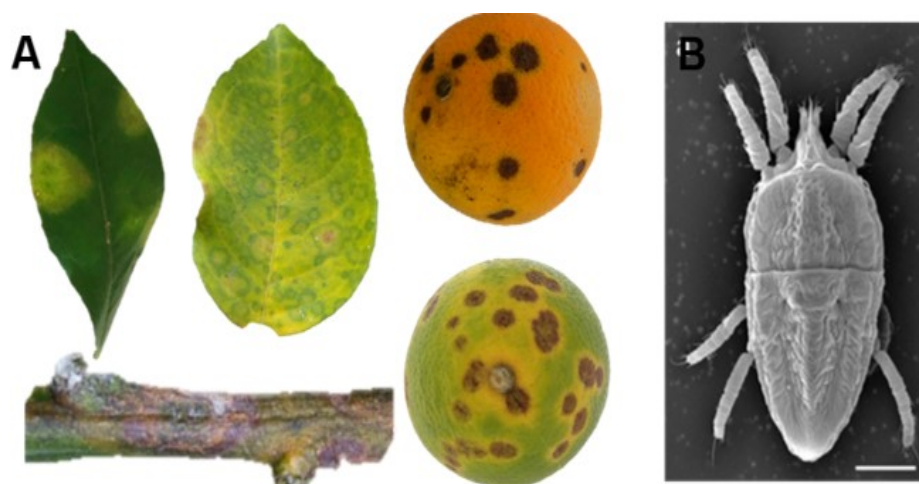


Figura 1: A. Lesões anelares cloróticas e necróticas em folhas, frutos e ramos de laranjeira doce (*Citrus x sinensis* (L.) Osbeck), típicos da leprose dos citros causada pelo vírus da leprose dos citros C (CiLV-C, sigla do nome em inglês, *Cilevirus leprosis*). Fotos: arquivo pessoal. B. Microscopia eletrônica de varredura de *Brevipalpus yothersi*, vetor do CiLV-C (Foto: Tassi et al., 2017).

Quase 5% dos gastos de manutenção de um pomar de laranjeiras doces são gastos com o controle químico dos ácaros para evitar a depreciação dos frutos e seca dos ramos (Bassanezi, 2017). Ainda assim, a taxa de queda prematura associada à LC tem aumentado, variando de 1,99% a 2,83% do total produzido nas últimas duas safras

(Fundecitrus, 2023), o que, no total, representa quase 14 milhões de caixas de 40,8 kg e perda de até US\$ 60 milhões (Moreira et al., 2022).

2.3 Vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* causadores da leprose dos citros

A LC é causada por diversos vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* (VTBs) (Freitas-Astúa et al., 2018). Além de causar doenças em laranjeiras, os VTBs afetam outras culturas de interesse econômico como o cafeeiro, o maracujazeiro e diversas plantas ornamentais, como orquídeas (Kitajima et al., 2003, 2010). Os VTBs são classificados em três gêneros: *Dichorhavirus*, da família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales* (Dietzgen et al., 2018), e *Cilevirus* e *Higrevirus*, da família *Kitaviridae*, ordem *Martellivirales* (Olmedo Velarde et al., 2023; Quito-Avila et al., 2021; Rodrigues, 2022). Os dichorhavirus são vírus de RNA com o genoma dividido em duas moléculas de fita simples e sentido negativo que se replicam no núcleo das células hospedeiras (Dietzgen et al., 2018). Já os cilevírus e higrevírus apresentam, respectivamente, duas e três moléculas de RNA de fita simples e sentido positivo e se replicam no citoplasma das células hospedeiras (Ramos-González et al., 2023).

Ao menos quatro dichorhavirus causam sintomas de leprose em citros. O vírus da leprose dos citros N (CiLV-N, sigla do nome em inglês, *Dichorhavirus leprosis*), transmitido por *B. phoenicis* sensu stricto (Ramos-González et al., 2017) e o vírus da mancha clorótica dos citros (CiCSV, *Dichorhavirus citri*), transmitido por *B. yothersi* e, possivelmente, *B. aff. yothersi* (Chabi-Jesus et al., 2018), ocorrem esporadicamente em áreas marginais de produção de citros no Brasil. Enquanto o CiLV-N é encontrado em áreas com temperaturas mais amenas e maior altitude dos estados SP e PR, o CiCSV foi detectado apenas no PI. No sul do Brasil, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, outro dichorhavirus foi relatado infectando citros e causando sintomas similares aos de LC. O vírus da mancha brilhante dos citros (CiBSV, *Dichorhavirus australis*) é transmitido por *B. azores* e foi detectado apenas em pequenos pomares de laranjeira doce (Chabi-Jesus et al., 2023). Estirpes do vírus da mancha da orquídea (OFV, *Dichorhavirus orchidaceae*), transmitido por *B. californicus* (Kondo et al., 2003) foram encontradas infectando naturalmente diversas espécies de citros na Colômbia, no México, na África do Sul e no Havaí (Cook et al., 2019; Cruz-Jaramillo et al., 2014; Olmedo-Velarde et al., 2021; Roy et al., 2014). Apesar de OFV ocorrer em orquídeas no Brasil, o vírus não está

presente em pomares de citros, provavelmente devido à ausência do vetor nessa hospedeira (Ramos-González et al., 2017).

Dentre os cilevírus, apenas dois vírus causam LC. O vírus da leprose dos citros C2 (CiLV-C2, *Cilevirus colombiense*), transmitido por *B. yothersi*, foi relatado em citros apenas na Colômbia (Roy et al., 2013). O vírus da leprose dos citros C (CiLV-C, *C. leprosis*), transmitido naturalmente por *B. yothersi* e experimentalmente por *B. papayensis* (Nunes et al., 2018; Ramos-González et al., 2016), é o principal agente etiológico da LC na América Latina, encontrando-se amplamente distribuído no Brasil (Chabi-Jesus et al., 2021). Uma vez adquirido durante qualquer fase ativa do ácaro (larva, protoninfa, deutoninfa e adulto) (Tassi et al., 2017), o CiLV-C possivelmente se movimenta de maneira paracelular no vetor (Tassi et al., 2022), onde se replica provavelmente em células específicas, ainda não identificadas (Ramos-González et al., 2023; Tassi et al., não publicado).

2.4 CiLV-C e a epidemiologia da leprose dos citros

CiLV-C é o vírus com maior dispersão geográfica dentre os cilevírus e afeta principalmente as laranjeiras doces e, em menor grau, outras espécies e/ou híbridos de citros, exceto os limoeiros (*C. limon* (L.) Osbeck), as limas comuns (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle), limas ácidas (*C. latifolia* (Yu. Tanka) Tanaka), laranjeiras azedas (*C. aurantium* (L.)) e toranjas (*C. x paradisi* Macfad.), que são considerados resistentes (Bastianel et al., 2008, 2018; Freitas-Astúa et al., 2008). O CiLV-C também infecta naturalmente a rutácea *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr., com relatos na Colômbia (León et al., 2008), e trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.), uma monocotiledônea comumente encontrada em pomares de citros no Brasil (Nunes et al., 2012). Na Colômbia diversos relatos indicam a infecção natural de CiLV-C em hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L.), cicas (*Cycas* spp. L.), cana-da-índia (*Canna indica* L.), *Dieffenbachia* (Jacq.) Schott sp. e orelha de elefante (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don) (León et al., 2023). Não há movimentação sistêmica do vírus nas plantas hospedeiras (Freitas-Astúa et al., 2018).

O CiLV-C possui partículas envelopadas em formato baciliforme e genoma bissegmentado com cauda de poli A no extremo 3' (Locali-Fabris et al., 2006). O primeiro segmento genômico do CiLV-C (RNA1, ~9kb) engloba dois quadros abertos de leitura (ORFs, do termo em inglês *Open Reading Frames*): *RdRp* e *p29*. *RdRp* é a maior ORF dos segmentos genômicos de CiLV-C e codifica os domínios metiltransferase, helicase e

RdRp2 enquanto a *p29* codifica a proteína do capsídeo (Ramos-González et al., 2023). O RNA2 (~5kb) é composto por quatro ORFs: *p15*, *p61*, *p32* e *p24*. A ORF *p15* codifica uma proteína com possível função de supressão de silenciamento gênico (Leastro et al., 2020), e é separada da ORF *p61* pela região intergênica, de 0.8-1kb, onde pequenas ORFs podem ser encontradas em alguns membros do gênero *Cilevirus* (Quito-Avila et al., 2021; Ramos-González et al., 2020, 2021). As ORFs *p61* e *p24* codificam proteínas estruturais do virion, sendo a P61 uma provável glicoproteína viral (Arena et al., 2020). A ORF *p32* codifica a proteína de movimento (MP), que é membro da superfamília 30K (Leastro et al., 2021).

A população do CiLV-C está subdividida em três linhagens. Os vírus dessas três linhagens apresentam cerca de 85% de identidade nucleotídica e diferente dispersão geográfica (Chabi-Jesus et al., 2021; Ramos-González et al., 2016). Os vírus da linhagem CRD foram inicialmente detectados em Cordeirópolis, SP, (Local-Fabris et al., 2006) e os da linhagem SJP em São José do Rio Preto, SP (Ramos-González et al., 2016). A linhagem ASU foi caracterizada a partir de uma amostra herborizada coletada em 1937 na cidade de Assunção, Paraguai (Chabi-Jesus et al., 2021). Os isolados da linhagem CRD estão amplamente distribuídos em pomares comerciais e não comerciais de citros pela América Latina enquanto isolados da linhagem SJP se mantêm restritos às áreas comerciais do cinturão citrícola de São Paulo e do triângulo mineiro, onde são prevalentes (Chabi-Jesus et al., 2021). A presença de isolados da linhagem ASU em amostras contemporâneas é desconhecida.

2.5 Ácaros do gênero *Brevipalpus* e o controle da leprose dos citros

O gênero *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) abrange em torno de 300 espécies válidas de ácaros fitófagos (Castro et al., 2020), das quais menos de uma dezena foram identificadas como vetores de fitovírus (Chabi-Jesus et al., 2023; de Lillo et al., 2021; Olmedo Velarde et al., 2023; Ramos-González et al., 2023). Em geral, os *Brevipalpus* são polípagos, cosmopolitas e colonizam diversas culturas de importância econômica, entre elas citros, café e maracujá (Freitas-Astúa et al., 2018; Kitajima et al., 2003, 2010). Algumas espécies de *Brevipalpus* são haploides durante todo o seu ciclo de vida, se reproduzem a partir de partenogênese telítica e seus adultos são em maioria fêmeas devido à presença de uma bactéria endossimbionte denominada *Cardinium* spp. (Alberti et al., 2014; Weeks et al., 2001). No conjunto, os ácaros do gênero *Brevipalpus* são

considerados uma praga de alto risco fitossanitário (MAPA, 2022), devido ao seu papel como vetor de fitovírus. Entre as espécies do gênero, *B. yothersi* Baker (Fig. 1B) é a mais comum em pomares de citros do Brasil e a principal vetora de CiLV-C (Ramos-González et al., 2016).

Diversas práticas culturais são recomendadas para o manejo da LC em campo. Entre elas estão a poda de plantas sintomáticas, o uso de cercas vivas/quebra-ventos e a eliminação de plantas hospedeiras alternativas dos ácaros e do vírus para evitar a entrada do vetor nos pomares de citros e reduzir possíveis fontes do vírus (Bassanezi, 2004). No entanto, devido ao papel preponderante do vetor para a disseminação da LC em campo, o manejo da doença é feito quase que exclusivamente através do monitoramento da população dos ácaros e da aplicação de acaricidas (Bassanezi et al., 2019).

O controle químico dos ácaros *Brevipalpus* no cinturão citrícola de São Paulo e no triângulo mineiro custa em média US\$ 54 milhões/ano (Bassanezi et al., 2019), com poucas opções de acaricidas para a citricultura (Vechia et al., 2022). A escassa disponibilidade de princípios ativos apresenta um desafio ao programa de rotação de acaricidas, cujo principal objetivo é prevenir a seleção de populações resistentes (Bassanezi, 2018; Moreira et al., 2022). Subpopulações de *Brevipalpus* resistentes ao espiroclorfenol, principal acaricida utilizado contra a LC, e ao propargite e hexitiazox, já foram relatadas (Campos & Omoto, 2002; Franco et al., 2007; Rocha et al., 2021).

O controle de outras doenças que afetam a cultura de laranja também pode interferir no controle da LC. A utilização de inseticidas para o controle do psilídeo (*Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae)), vetor da bactéria *Candidatus Liberibacter* spp., causadora do HLB, tem intensificado cada vez mais devido à alta incidência do HLB em pomares de citros (Alquezar et al., 2022). A mistura de acaricidas e inseticidas no tanque de pulverização, uma ação que tem como finalidade a redução dos custos de aplicação, pode diminuir a eficácia dos acaricidas (Della Vechia et al., 2018, 2019, 2023), o que pode resultar em maiores populações de ácaros. Além disso, a população de predadores naturais de *Brevipalpus* pode ser afetada pelo uso de acaricidas (Silva et al., 2009; Andrade et al., 2010; Sarbaz et al., 2017; Silva et al., 2011) e de inseticidas (Della Vechia et al., 2019; Fuzita et al., 2014; Silva et al., 2012). Assim, os métodos utilizados para o manejo da LC através do controle do ácaro vetor tem se tornando inviáveis, demonstrando a importância de investigar outras abordagens.

2.6 Alternativas para o controle de doenças virais em citros, com foco na leprose dos citros

2.6.1 Melhoramento genético tradicional

Diversas alternativas promissoras podem ser exploradas para o manejo eficaz e sustentável de doenças virais em plantas. A seleção de variedades resistentes por meio do melhoramento genético pode ser uma estratégia eficiente para reduzir a suscetibilidade das plantas a essas doenças. A possibilidade de programas de melhoramento genético para obtenção de variedades cítricas resistentes à LC por métodos tradicionais de cruzamento tem sido abordada (Bastianel et al., 2006, 2008; Freitas-Astúa et al., 2008). Dentre as variedades cítricas, a laranjeira doce é considerada a mais suscetível enquanto tangerinas (*C. reticulata*) e híbridos demonstram maior nível de resistência à LC (Bastianel et al., 2006, 2008).

A exploração de genótipos de citros resistentes à LC pode contribuir para o entendimento sobre a existência de potenciais genes de resistência que auxiliariam no desenvolvimento de híbridos resistentes à LC. As lesões causadas por CiLV-C são o resultado de uma interação incompatível, o que levanta a hipótese da presença de um gene de resistência *R*. A presença desse gene, por sua vez, desencadearia uma resposta de hipersensibilidade (HR), que ocorre de maneira específica da espécie hospedeira ao patógeno. Entretanto, a HR desencadeada por CiLV-C é observada em diversas hospedeiras, sugerindo que a indução de HR é possivelmente mediada por mecanismos que não envolvem a expressão de genes *R* (Arena et al., 2020). As análises realizadas por QTLs (*Quantitative trait loci*) em diversos híbridos cítricos demonstraram que poucos genes estão associados à resistência à LC e evidenciaram a ausência de gene *R* associado à resistência ao CiLV-C em diversos híbridos cítricos (Bastianel et al., 2006).

A aplicação do melhoramento genético por meio do cruzamento controlado encontra diversas dificuldades em citros, devido a características biológicas inerentes às espécies (Gmitter & Talon, 2008). Estas dificuldades incluem ciclo juvenil prolongado, a presença de embriões nucelares (apomixia nucelar), incompatibilidade e esterilidade sexual, além de alta heterozigose. Ademais, o conhecimento sobre a herança de muitas características de interesse agrônomo nas espécies cítricas é limitado (Machado et al., 2011; Oliveira et al., 2014). Estes fatores encarecem os programas de melhoramento genético de citros, exigem grandes áreas para a avaliação dos híbridos em campo e podem

ser processos complexos com relativamente baixo potencial de sucesso (Gmitter & Talon, 2008; Oliveira et al., 2014).

2.6.2 Controle biológico de *Brevipalpus* spp.

Outra possibilidade para promover um controle mais sustentável da LC é por meio da utilização de organismos benéficos, como predadores naturais, para limitar a população do ácaro vetor e, conseqüentemente, mitigar a disseminação da doença. O controle biológico com ácaros predadores tem sido estudada com foco em *Neoseiulus californicus* e *N. longispinosus* (Acari: Phytoseiidae), *Agistemus brasiliensis* (Acari: Stigmaeidae), *Amblyseius largoensis* (Acari: Phytoseiidae), *Hemicheyletia bakeri* (Acari: Cheyletidae), *Euseius citrifolius* e *E. concordis* (Acari: Phytoseiidae) (Argolo et al., 2020; Da Silva et al., 2015; Hesketh & Sato, 2023). Entretanto se desconhece a eficiência econômica do controle biológico de *Brevipalpus* por meio de ácaros predadores em condições de campo. Os fungos entomopatogênicos *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana* apresentaram potencial como agentes de controle biológico de *B. phoenicis* adultos em laboratório (Conceschi, 2013). O bioinseticida Challenger é composto por *I. fumosorosea* (CEPA ESALQ 1296), desenvolvido para o controle do psilídeo dos citros (*D. citri*), e foi relatado com até 90,5% de eficiência na mortalidade de *B. yothersi* (Koppert, 2020; Rossi, 2022). A aplicação de ácaros predadores em conjunto com os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* evidenciou uma alternativa para o controle biológico que garantiu uma maior mortalidade de *B. yothersi* em condição de laboratório em comparação com a utilização de apenas ácaros predadores (Vázquez-Benito et al., 2022). No entanto, não há dados consistentes disponíveis de ensaios de campo.

2.6.3 Proteção cruzada

A proteção cruzada refere-se à capacidade de uma planta de adquirir resistência a um vírus severo por meio da exposição controlada a uma estirpe menos severa do mesmo vírus (Gal-On & Shibolet, 2006). A aplicação prática mais notável da utilização da proteção cruzada, também conhecida como pré-imunização, ocorre na citricultura para o controle da tristeza dos citros, causada pelo vírus da tristeza dos citros (CTV, sigla do nome em inglês, gênero *Closterovirus*) mediante a utilização de variantes atenuadas (menos severas) desse vírus (Folimonova et al., 2020). Citricultores utilizam isolados

atenuados de CTV para proteger a cultura dos citros na Austrália, na África do Sul, no Peru e no Brasil (Folimonova et al., 2020). A proteção acontece na medida que existe uma identidade genética entre a variante atenuada do CTV e o isolado mais severo ao qual se busca proteção (Folimonova, 2013). No entanto, não é possível aplicar a proteção cruzada contra CiLV-C uma vez que esse vírus não é sistêmico e não existem relatos sobre a existência de estirpes menos severas do patógeno.

2.6.4 Edição gênica

A edição genética por meio do sistema CRISPR/Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) é uma outra abordagem para o desenvolvimento de plantas resistentes a doenças virais. CRISPR/Cas é um mecanismo de defesa procariótico, originalmente evoluído para combater plasmídeos e vírus de DNA, que tem sido utilizado para a edição gênica em organismos eucarióticos (Liu et al., 2022). O sistema inclui a proteína endonuclease Cas e um RNA guia único (sgRNA), que contém uma sequência de 20 nucleotídeos (nts) responsável por direcionar a clivagem de fita dupla do DNA na região complementar. A reparação desse corte pela maquinaria celular resulta em deleções ou inserções que podem levar à desativação do gene alvo. Além disso, o sistema CRISPR também pode ser direcionado para RNA, levando a clivagens em fita simples (Price et al., 2015; Zhang et al., 2019). Essa descoberta possibilitou a utilização do CRISPR tanto no direcionamento ao DNA ou RNA viral quanto na inativação de genes “provirais” da planta hospedeira, que são essenciais para a infecção viral (Cao et al., 2020; Khan et al., 2022).

A aplicação do sistema CRISPR/Cas para combater infecções virais não está isento de algumas desvantagens. A indução deliberada de mutações nos genomas virais podem contribuir para a evolução acelerada de vírus, que poderiam ser capazes de contornar a resistência gerada uma vez que mutações e recombinações são os principais mecanismos de evolução de vírus (Mehta et al., 2019; Robertson et al., 2022). Mutações geradas a partir do sistema CRISPR-Cas falharam em diminuir a acumulação do vírus do mosaico da mandioca africana (ACMV, gênero *Begomovirus*) e foi observado que 33-48% dos genomas editados desse vírus desenvolveram uma mutação que conferiu resistência à edição (Mehta et al., 2019). Para evitar esse risco, uma estratégia é direcionar a edição gênica para múltiplos alvos no genoma viral, com o objetivo de evitar o surgimento de novas estirpes virais, como foi demonstrado para o vírus da ondulação da folha de pimenta

(ChiLVC, gênero *Begomovirus*) (Khan et al., 2022; Roy et al., 2019). Entretanto essa abordagem exige a expressão constitutiva dos componentes do sistema CRISPR em plantas transgênicas (Robertson et al., 2022). Assim, apesar de as plantas editadas não estarem sujeitas às mesmas restrições regulatórias dos organismos geneticamente modificados (OGMs), plantas resistentes à infecções virais desenvolvidas por meio do CRISPR podem estar sob regulamentações de OGMs, o que a coloca a par das outras tecnologias envolvendo transgênicos (Taliensky et al., 2021).

As explorações do sistema CRISPR contra vírus de RNA têm sido empregadas através da edição de fatores provirais dos hospedeiros, como fatores de transcrição e genes de suscetibilidade (Khan et al., 2022). No caso do patossistema LC, a mutação de genes de suscetibilidade na planta hospedeira mediante CRISPR enfrenta um desafio adicional que é a falta de conhecimento sobre qual gene ao ser modificado poderia reduzir a susceptibilidade ao CiLV-C sem afetar o desenvolvimento da planta. Além disso, esse processo pode ser custoso e demorado em plantas perenes, dado que seria necessário selecionar plantas geradas a partir de gametas sem os componentes do sistema CRISPR (Kalinina et al., 2020).

Alternativamente, uma descoberta recente na edição mediada por CRISPR/Cas13 demonstrou que na ausência da Cas13, o RNA guia (gRNA) pode provocar reduções na acumulação do RNA viral e endógeno da planta (Sharma et al., 2022). Esse mecanismo, denominado silenciamento gênico induzido por guia (GIGS, em inglês), depende da similaridade de sequência do gRNA e do RNA alvo, e funciona de maneira análoga à via de RNAi (item 2.7). Essa abordagem para resistência ao grapevine virus A (GVA, gênero *Vitivirus*) foi explorada em plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana*, que apresentaram menor carga viral (Spencer et al., 2023). Essa descoberta pode fornecer um novo caminho para interferência de infecção viral em planta (Sharma et al., 2022). No entanto, do ponto de vista do seu mecanismo de ação, é similar à indução do silenciamento gênico, o qual tem sido demonstrado que possui a maior eficiência, gerando até imunidade, quando é induzido por moléculas de dsRNA (Fusaro et al., 2006; Smith et al., 2000; Taliensky et al., 2021).

2.7 Silenciamento gênico pós-transcricional e sua aplicação em campo

A obtenção de plantas resistentes à infecções virais pode ocorrer mediante silenciamento gênico pós-transcricional (SGpT), também conhecido como RNA

interferente (RNAi). Observado inicialmente em plantas (Kasschau & Carrington, 1998; Napoli et al., 1990), o RNAi é um mecanismo de regulação gênica extremamente conservado entre eucariotos ao nível transcricional e pós-transcricional. O SGpT funciona como a principal arma de resposta antiviral em plantas (Yang & Li, 2018). Este mecanismo envolve o reconhecimento de RNA de fita dupla (dsRNA), que é clivado em pequenos RNAs interferentes de 20-24 nts (siRNA) por proteínas Dicer. Associados às proteínas Argonata, os siRNAs formam o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do termo em inglês *RNA induced silencing complex*), que degradam as moléculas de RNA, incluindo as de origem viral, ou inibem a tradução do mRNA. A regulação da expressão de genes endógenos mediante o SGpT depende da produção de microRNA, que se originam mediante a degradação por Dicer dos pré-microRNA, expressos a partir de genes *MiRNA*. A regulação da expressão gênica mediada pelo mecanismo de silenciamento também pode ocorrer a nível transcricional (Jin et al., 2022).

Em arabidopsis existem quatro proteínas endonuclease Dicer (DCL1-4). Elas pertencem à família de proteínas RNase III e possuem domínios para ligação a dsRNA, helicase, RNaseIII e PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) (Parent et al., 2015). DCL1 e DCL3 estão associadas com o silenciamento pós-transcricional de genes endógenos mediante miRNA e com a metilação de DNA que condiciona o silenciamento transcricional, respectivamente, e DCL2 e DCL4 são as principais atuando na defesa antiviral (Bouché et al., 2006; Fusaro et al., 2006). O dsRNA viral é reconhecido através do domínio PAZ da DCL2-4 e clivado pelo domínio RNaseIII, gerando siRNAs de 21-24 nts. Uma das fitas do siRNAs (fita antisense, guia) é incorporada por proteínas Argonautas para formar o RISC enquanto a outra (fita sense, passageira) é degradada por endonucleases. As proteínas AGOs possuem o domínio PAZ para ligação à fita guia do siRNA e o domínio PIWI que catalisa a clivagem do mRNA complementar à fita guia (Zhang et al., 2015). As fitas de RNAs clivadas são posteriormente degradadas por exoribonuclases. No genoma de arabidopsis são encontrados 10 genes *AGOs*, e a proteína AGO1 e AGO2 têm como função principal a defesa antiviral por SGpT (Carbonell & Carrington, 2015). As proteínas RDR (RNA polimerase dependente de RNA) desempenham um papel crucial na biogênese de siRNA e na resposta antiviral (Dzianott et al., 2012; Musidlak et al., 2017). No genoma de arabidopsis, seis genes codificadores de proteínas RDR foram identificados. Dentre esses genes, RDR1 e RDR6 são os principais atuando na defesa

antiviral, através da produção de siRNAs e pela amplificação do silenciamento a partir do siRNA (Garcia-Ruiz et al., 2010; Yoshikawa et al., 2021).

Estratégias baseadas na indução do SGpT para o controle da replicação viral podem ser implementadas mediante a produção de plantas transgênicas. Uma vez transcritos e formados os dsRNA, a planta pode pré-estabelecer uma barreira contra a infecção viral produzindo RISC com os siRNA derivados do dsRNA, que podem induzir a degradação de genes virais ou de fatores de suscetibilidade da própria planta (Deng et al., 2022). Construções gênicas cujos transcritos se enovelam em formato de grampo (hpRNA, do termo em inglês *hairpin* RNA) têm sido reconhecidas como os melhores indutores para a produção de siRNA e, conseqüentemente, dos complexos RISC (Fusaro et al., 2006; Smith et al., 2000). A eficiência da estratégia de indução de silenciamento para a redução ou inibição da infecção viral também depende da região do genoma viral alvo do silenciamento (Akbarimotlagh et al., 2023; Mohamed et al., 2022; Oliver et al., 2023).

O mecanismo de RNAi também pode ser ativado através da aplicação foliar de dsRNA, o qual induz o SGpT, confere resistência a doenças e evita a utilização de plantas transgênicas no campo. Essa estratégia, conhecida como SIGS (do termo em inglês, *spray induced gene silencing*), pode ser uma alternativa de aplicação mais simples em comparação com a criação de plantas transgênicas (Dalakouras et al., 2020; Rank & Koch, 2021). Quando comparando diretamente com a indução do silenciamento pela hospedeira (do termo em inglês, HIGS), o SIGS demonstrou ser igualmente eficaz e, em alguns casos, até mais eficiente, em condições de laboratório (Höfle et al., 2020; Koch et al., 2019). No entanto, apesar das promissoras possibilidades do SIGS há desafios a serem superados para sua aplicação (Rank & Koch, 2021). Entre os obstáculos estão a instabilidade do dsRNA no ambiente, as diferentes nanopartículas para entrega de dsRNA, a absorção do dsRNA pela célula vegetal e a produção e custo em larga escala das moléculas de RNA indutoras (Hoang et al., 2022; Jalaluddin et al., 2023; Mitter et al., 2017).

O SGpT tem sido empregado no combate a doenças virais desde 1998, quando a primeira planta de mamoeiro transgênica resistente à infecção viral através do RNAi foi utilizada comercialmente (Gonsalves, 1998). Os eventos conhecidos como Rainbow e SunUp, explorados comercialmente na atualidade, foram desenvolvidos para combater o vírus do mosaico do mamoeiro (PRSV, gênero *Potyvirus*), que causa a mancha anelar do

mamoeiro e devastou grande parte da produção de mamão no Havaí, EUA, entre 1992-1997. No Brasil, plantas transgênicas de feijão-comum foram desenvolvidas para combater a infecção pelo vírus do mosaico dourado do feijoeiro (BGMV, gênero *Begomovirus*). Essas plantas produzem um hpRNA contendo um fragmento do gene *ACI* do vírus (Aragão et al., 2013; Bonfim et al., 2007). Conhecido inicialmente como Embrapa 5.1, o Feijão RMD (identificação atual) está disponível no mercado, o que representa um dos exemplos mais recentes e bem-sucedidos da aplicação do SGpT contra infecção viral através de plantas transgênicas (EMBRAPA, 2015; Souza et al., 2018).

2.7.1 Citrus resistentes a infecções virais pela indução do silenciamento gênico

A utilização de RNAi em *Citrus* spp. tem sido explorada nos últimos anos para o controle de diversos patógenos (Goulin et al., 2019). A indução de resistência contra o vírus da tristeza dos citros (CTV, gênero *Closterovirus*) em lima ácida (*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle) transgênica foi explorada com diversos tipos de indutores do silenciamento, como sequências apenas no sentido senso, sequências antisenso e com construções para expressão de hpRNA (Fagoaga et al., 2006; López et al., 2010; Soler et al., 2011, 2012). A resistência foi observada em algumas linhagens transgênicas associada ao silenciamento gênico pós-transcricional e ao silenciamento transcricional através da metilação do transgene (Fagoaga et al., 2006; López et al., 2010). Um maior nível de resistência e imunidade foi verificado pelo silenciamento induzido pela expressão de hpRNA com sequências dos genes *p25*, *p23* e *p20*. As plantas modificadas geneticamente não desenvolveram sintomas virais após infecção e acumularam altos níveis de siRNAs específicos ao genoma de CTV (Soler et al., 2012). Outros trabalhos demonstraram a redução da acumulação viral e a recuperação da planta através da aplicação tópica em plantas selvagens infectadas com CTV de um dsRNA contendo sequências dos genes *p20*, *CP* e *p23* para induzir o SGpT (Borah et al., 2023). Por outro lado, a expressão de hpRNA com sequências do gene *CP* do vírus da sorose dos citros (CPsV, gênero *Ophiovirus*) em laranja doce transgênica também demonstrou o desenvolvimento de altos níveis de resistência à infecção e até contra duas estirpes do vírus (De Francesco et al., 2017; Reyes et al., 2011). A utilização de uma planta transgênica resistente ao CPsV como enxerto intermediário entre o porta-enxerto e a copa não transgênicos demonstrou que o sinal de silenciamento gerado no tecido do enxerto intermediário induziu o silenciamento nos

tecidos selvagens, garantido tolerância e recuperação à infecção por CPsV (De Francesco et al., 2020).

2.8 Transformação genética de *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana é uma planta modelo comumente utilizada em estudos de interação patógeno-planta por possuir ciclo de vida curto e ser de pequeno tamanho (Nishimura & Dangl, 2010). Além disso, a planta se desenvolve rapidamente o que, no conjunto, facilita a análise de um grande número de indivíduos em espaços físicos e temporais limitados. A técnica de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tem sido empregada com sucesso em *Arabidopsis*, especificamente através do método conhecido como *floral dip* (Clough & Bent, 1998). O método de transformação *in planta* em *Arabidopsis* descrito inicialmente por Feldmann & Marks (1987) dispensa o cultivo *in vivo* dos tecidos e a regeneração das plantas, o que reduz o risco de variações somaclonais e contribui para manter a estabilidade genômica das plantas transgênicas (Feldmann & Marks, 1987; Labra et al., 2004). A técnica *floral dip* inclui a imersão das inflorescências em uma suspensão bacteriana contendo o vetor de transformação com o gene de interesse. A suspensão contém também sacarose ou glicose para indução da expressão dos genes *vir* de *A. tumefaciens* (Cangelosi et al., 1990). As proteínas VIR direcionam a transferência do T-DNA (vetor de transformação) da agrobactéria ao núcleo da célula vegetal, no caso, nos gametas femininos (Clough & Bent, 1998; Desfeux et al., 2000).

A técnica *floral dip* é a mais empregada na produção de *Arabidopsis* transgênicas. O método é simples de implementar e resulta em dezenas de linhas transgênicas em um curto período de tempo devido ao grande número de sementes produzidas pela planta (Zhang et al., 2006). Por esses motivos é preferido para o teste rápido na prova de conceito de construções gênicas.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia da indução de resistência ao CiLV-C mediante a ativação do mecanismo de silenciamento gênico pela expressão de moléculas do tipo hairpinRNA em *Arabidopsis thaliana* transgênicas.

3.1 Objetivos específicos

(i) Desenvolver construções genéticas com as unidades transcricionais que expressam os hairpinRNA derivados do genoma de CiLV-C no vetor binário pCAMBIA 2300;

(ii) Obter plantas transgênicas de *A. thaliana* com as construções para expressar hairpinRNAs derivados do genoma de CiLV-C mediante *A. tumefaciens* a partir da técnica *floral dip*;

(iii) Avaliar a eficácia da estimulação do SGpT para resistência à infecção de CiLV-C mediante RT-qPCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Escolha das regiões alvos no genoma de CiLV-C para as construções de indução do silenciamento gênico

Para desenvolver construções genéticas para a indução do mecanismo de RNAi com alvo no genoma de CiLV-C foram identificadas as regiões conservadas entre as estirpes de CiLV-C. Para tanto, os perfis de identidade dos nucleotídeos do RNA1 e do RNA2 das três estirpes virais (SJP - RNA1 KP336746, RNA2 KP336747; CRD - RNA1 NC008169, RNA2 NC008170; ASU - RNA1 MT554532, RNA2 MT554546) foram avaliados no programa Simplot versão 5.3.1 para identificar uma região no genoma da estirpe SJP conservada entre as três estirpes. Os iniciadores para amplificar esses fragmentos foram desenhados de forma que, além das regiões específicas aos genes alvos, na sua posição 5' apresentaram sítios de restrição para facilitar a clonagem direcionada dos amplicons (Tabela 1).

Tabela 1: Iniciadores desenhados para a amplificação das regiões genômicas de CiLV-C SJP escolhidas como alvo do silenciamento gênico: *RdRp2*, *MET* e *p15*. Sítios de restrição convenientemente adicionados ao iniciador estão marcados em negrito e sublinhado. pb: pares de bases.

Iniciador	Sequências (5'-3')	Região alvo em CiLV-C SJP	Sítio de restrição inserido	Tamanho do amplicon
hp RdRp2 5'	<u>GGGGTACCGGATC</u> <u>C</u> ATCTCGACCTTGA CTTGGCT	6270-6289 RNA1	<i>KpnI/BamHI</i>	567 pb
hp RdRp2 3'	G <u>CTCTAGAGCT</u> CTG GTGTCTTAGCATGTT CTGAAC	6788-6811 RNA1	<i>XbaI/SacI</i>	
hp MET 5'	<u>GGGGTACCGGATC</u> <u>C</u> TTTTCTGGCTCAA CGTCTGG	1055-1074 RNA1	<i>KpnI/BamHI</i>	403 pb
hp MET 3'	G <u>CTCTAGAGCT</u> CAG CCCATTACGACCCT TGAA	1412-1431 RNA1	<i>XbaI/SacI</i>	
hp p15 5'	<u>GGGGTACCGGATC</u> <u>C</u> GATTGAGTGGGAC AGTTTC	94-112 RNA2	<i>KpnI/BamHI</i>	370 pb
hp p15 3'	G <u>CTCTAGAGCT</u> CGG TCTTGACGACGCAT AATAC	417-437 RNA2	<i>XbaI/SacI</i>	

4.2 Análise *in silico* dos fragmentos escolhidos para indução do silenciamento gênico

Análises bioinformáticas com os fragmentos do genoma de CiLV-C estirpe SJP presente nas construções para estimular o silenciamento gênico foram conduzidas com o propósito de identificar as regiões alvo no genoma das outras estirpes virais e da planta *A. thaliana*. Essas análises estimaram o grau de identidade dos possíveis siRNAs de 19 e 21 nucleotídeos (nts) gerados a partir das construções desenhadas com regiões homólogas nos genomas virais, o que garantiria uma proteção abrangente, e nos genomas das plantas hospedeiras e do vetor, que representariam alvos não desejados (*off-target*). Para as análises foram utilizadas as ferramentas bioinformáticas dsCheck (Naito et al., 2005) e si-Fi (siRNA-Finder) (Lück et al., 2019). Os fragmentos virais contidos nas construções

genéticas foram avaliados pelo dsCheck, que permite a identificação de siRNAs de 19 nts. com até 2 disparidades (*mismatch*) contra o genoma de *A. thaliana* (RefSeq GCF_000001735.4). A análise feita pelo si-Fi permite a identificação dos siRNAs totais e eficientes, de 21 nts eficientes com 0-3 disparidades, contra uma base de dados personalizada de acordo com os seguintes parâmetros: verificação do nucleotídeo terminal no extremo 5' das duas fitas e seleção da fita guia ou passageira pela estabilidade termodinâmica.

Além de alvos no genoma de *A. thaliana*, os possíveis alvos dos siRNAs gerados a partir do genoma do isolado SJP foram analisados contra o RNA1 e o RNA2 de CiLV-C SJP (RNA1 KP336746, RNA2 KP336747), CRD (RNA1 NC008169, RNA2 NC008170) e ASU (RNA1 MT554532, RNA2 MT554546) pela ferramenta si-Fi, assim como os RNA1 e RNA2 de PfGSV (*Cilevirus passiflorae*; MK804171 e MK804172) e CiLV-C2 (*Cilevirus colombiense*; JX000024 e JX000025). Os genomas de laranja doce (*Citrus x sinensis*, GCF_022201045.2) e de *B. yothersi* (GCA_003956705.1) também foram avaliados com a ferramenta si-Fi com os fragmentos de CiLV-C escolhidos como alvo do SGpT.

4.3 Materiais vegetais utilizados

As sementes de *Arabidopsis thaliana* Col-0 selvagens (WT, do inglês *wild type*) foram gentilmente disponibilizadas pela Prof.^a Dr.^a Maria Teresa Portes do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP). A germinação das sementes e o desenvolvimento inicial das plantas foram realizadas em uma mistura de substrato (BioMix® Flores e Folhagens) e vermiculita (3:1) autoclavada e hidratada com solução nutritiva MS (Murashige & Skoog, Sigma-Aldrich) diluída em água MilliQ (1/2x) em vasos contendo ~10 sementes. Após duas semanas de crescimento, as quatro plantas que apresentavam o tamanho das folhas mais homogêneo e sem desenvolvimento de inflorescências foram mantidas por vaso para posterior transformação genética por *floral dip*. As plântulas e plantas de *Arabidopsis* foram mantidas em câmara de crescimento Conviron Adaptis 1000 sob fotoperíodo de 16 h dia a 23°C e 8 h noite a 22°C.

As amostras de frutos de laranja doce com CiLV-C SJP foram obtidas através da colaboração com o Dr. Renato Beozzo Bassanezi do Fundecitrus (Araraquara, SP) de áreas com incidência de leprose dos citros.

4.4 Extração de RNA total de amostras vegetais e síntese de DNA complementar

Para a detecção de CiLV-C e obtenção dos fragmentos alvos, cerca de 100 mg de tecido vegetal (fruto e/ou folha) foram macerados em cadinho com pistilo na presença de nitrogênio líquido (N_{2(l)}). A extração de RNA total dos tecidos foi realizada com TRIzol® de acordo com o fabricante (Thermo Scientific, Waltham, EUA). A síntese de DNA complementar (cDNA; RT) foi realizada com o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega, Madison, EUA) de acordo com as instruções do fabricante no termociclador ProFlex™ Base (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). De início, 1 µL (aproximadamente 200-500 ng) da solução de RNA total extraído foi incubado a 70°C por 5 min junto com 4 µL de H₂O livre de RNases para desnaturação. O RNA desnaturado foi mantido em gelo e 1 µL da enzima RT (160 U/µL) e 2 µL do buffer do kit que contém iniciadores randômicos foram adicionados para uma reação total de 10 µL. Para a transcrição reversa (RT), as seguintes etapas foram seguidas: 25 °C por 5 min, 42 °C por 1 h, 70 °C por 15 min e mantido a 4 °C.

4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e gel de agarose

Para a amplificação dos fragmentos utilizados nas construções para expressão de *hairpin*RNA, a PCR foi realizada com amostras de frutos de laranja doce infectadas com CiLV-C SJP. A PCR foi realizada com 5 µL de GoTaq® G2 Master Mix (Promega, Madison, EUA), 1 µL do cDNA e 10 nM dos iniciadores específicos (Tabela 1) em um volume de reação total de 10 µL no termociclador ProFlex™ Base (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Para a amplificação dos fragmentos alvos, a PCR foi realizada com os seguintes ciclos: 94 °C por 5 min (1x); 94 °C por 30 s, 54 °C ou 56 °C por 30 s e 72 °C por 35 s (35x); e 72 °C por 5 min e a reação foi mantida a 4 °C.

Para a detecção de CiLV-C em frutos de laranja doce e nas populações de ácaros *B. yothersi* virulíferos, iniciadores específicos que amplificam os genes *p29* (RNA1) e *p24* (RNA2) de CiLV-C SJP foram utilizados (Chabi-Jesus et al., 2021; Ramos-González et al., 2016). A reação foi montada seguindo os mesmos passos descritos acima. A visualização dos amplicons resultantes foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio sob luz ultravioleta.

4.6 Desenvolvimento das construções genéticas para expressão de hpRNA viral em plantas transgênicas

Uma vez amplificados, os fragmentos virais foram inseridos independentemente no plasmídeo pHairpin (Ramos-González et al., dados não publicados). O vetor pHairpin é derivado do pUC18 e contém uma unidade transcricional para a expressão em plantas. Além do promotor 35S de CaMV, essa unidade é formada pelo terminador Nos (nopaline synthase terminator de *Agrobacterium tumefaciens*) e um sítio múltiplo de clonagem (SMC) (Figura 2A). No centro do SMC está inserido o íntron da catalase da folha de batata, um elemento que favorece a formação do *hairpin* durante o processo de sua remoção nos spliceossomas.

A jusante do promotor, no sentido 5'-3', os fragmentos virais foram clonados num processo direcionado através do uso dos sítios de corte das enzimas de restrição introduzidos nos iniciadores. Os fragmentos virais foram primeiramente clonados no sentido antisense pela digestão dos amplicons e do vetor com as enzimas *BamHI* e *SacI* e posteriormente inseridos no vetor pHairpin no sentido senso pela digestão com as enzimas *KpnI* e *XbaI* (Figura 2B). Uma vez geradas as unidades de transcrição englobando p35S/antisense-íntron-senso/tNos correspondentes a cada fragmento viral (frag-hp), elas foram removidas do vetor utilizando a enzima de restrição *PstI*. As unidades transcricionais foram então independentemente introduzidas no vetor binário pCAMBIA2300 (Figura 2C), o que foi confirmado pela digestão direcionada com a enzima *HindIII*.

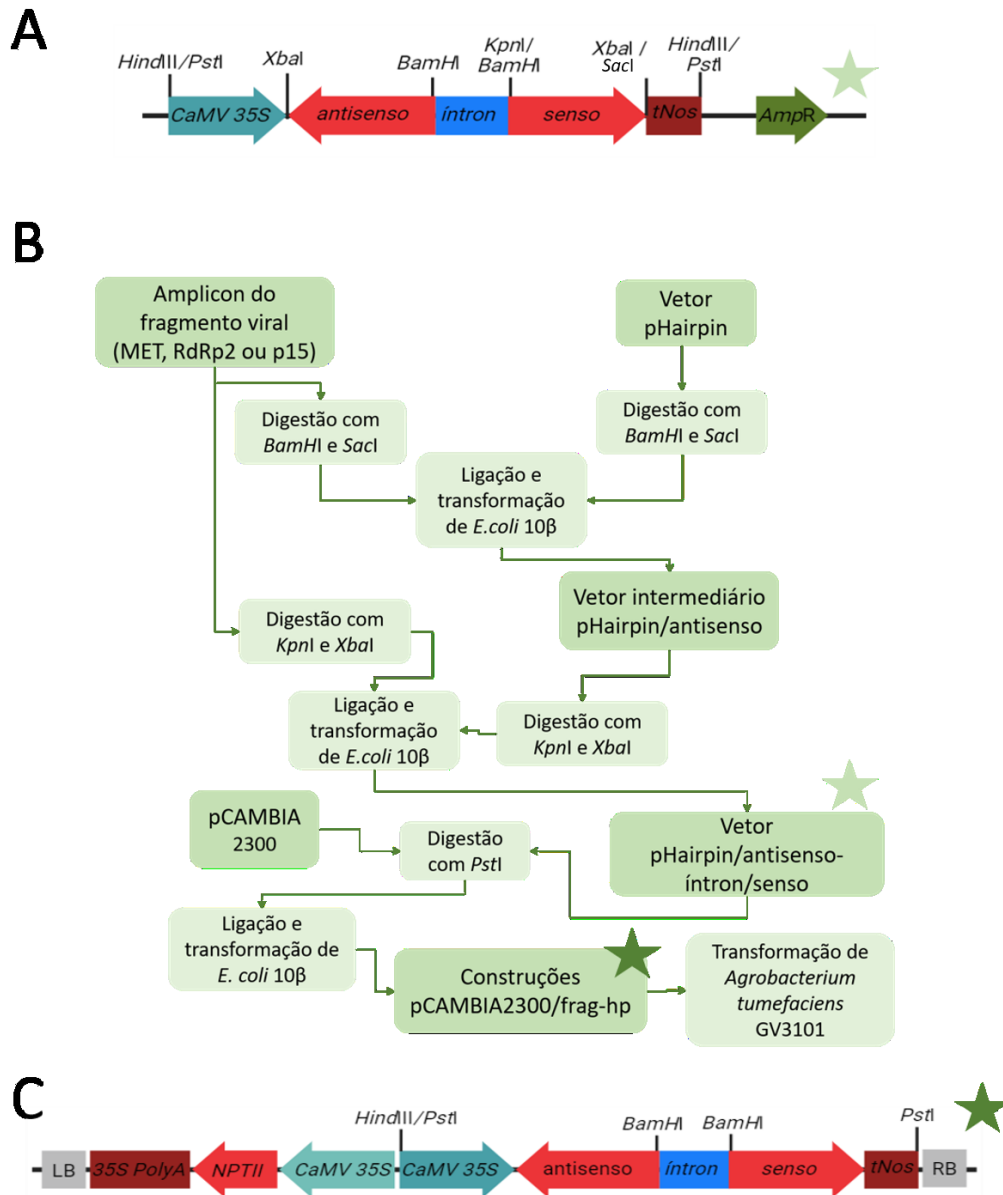


Figura 2: A. Representação linear de alguns elementos do plasmídeo pHairpin. A unidade transcricional de interesse contém o promotor 35S do CaMV, íntron da catalase de folha de batata, tNos e os fragmentos virais no sentido antisense e senso. Apenas as enzimas relevantes para a clonagem dos fragmentos virais no sentido antisense e senso estão indicadas. B. Fluxograma das etapas realizadas para a montagem das construções genéticas no vetor pHairpin e pCAMBIA2300. C. Representação linear da região do DNA de transferência (T-DNA) do vetor binário pCAMBIA2300 contendo as unidades transcricionais com os fragmentos virais inseridos e que confere resistência ao antibiótico canamicina (gene *ntpII*). LB: borda esquerda; 35S polyA: sinal de poliadenilação do 35S; gene *ntpII*; CaMV 35S: promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor. Segunda unidade transcricional contendo o promotor 35S, fragmento viral antisense (derivado do CiLV-C), íntron da catalase da folha de batata, fragmento viral senso (derivado do CiLV-C) e tNos. RB: borda direita. Apenas as enzimas utilizadas para a confirmação da construção estão indicadas. O tamanho de cada gene não condiz com a escala real.

Os amplicons correspondentes a cada um dos três fragmentos alvos do genoma de CiLV-C SJP foram purificados a partir do gel com o kit Wizard® PCR and Gel Clean-Up System (Promega, Madison, EUA). Cerca de 3 µg do vetor pHairpin e 1 µg dos amplicons foram utilizados nas reações de digestão com as enzimas de restrição (10 u/µL) apropriadas em uma reação total de 20 µL. Todas as digestões foram realizadas por 1 h a 37°C. Após a purificação da digestão a partir do gel, cerca de 50 ng dos amplicons foram utilizados nas reações de ligação com 100 ng dos vetores e 0,5 µL de DNA T4 Ligase (3 U/µL) (Promega, Madison, EUA) para uma reação total de 10 µL, que ocorreu a 4°C por cerca de 16 h.

Células de *Escherichia coli* 10Hβ foram transformadas com as construções pHairpin e pCAMBIA2300 mediante eletroporação (voltagem a 2.5 kV, MicroPulser Eletroporador Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Após o choque elétrico, as células foram mantidas em agitação por 1 hora em meio LB líquido (10 g/L de triptona, 10 g/L NaCl e 5 g/L de extrato de levedura). As culturas foram espalhadas em placas de Petri com meio LB sólido com ampicilina (100 µg/mL) ou canamicina (50 mg/mL). As bactérias recombinantes cresceram em LB líquido, os plasmídeos foram extraídos por lise alcalina (Bimboim & Doly, 1979) e a identidade deles foi avaliada por cortes com enzimas de restrição. Os plasmídeos de clones contendo as construções desenvolvidas nos vetores pHairpin e pCAMBIA2300 foram sequenciados para confirmação final.

4.7 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

Células competentes de *A. tumefaciens* estirpe GV3101 foram transformadas com os vetores binários por choque térmico. Cerca de 1 µg dos plasmídeos foram utilizados para transformar 150 µL de células competentes de *A. tumefaciens*, que foram submetidas a dois ciclos das seguintes etapas: 5 min em gelo (0°C), 5 min em nitrogênio líquido (N_{2(l)}) e 5 min a 37°C. As células transformadas foram incubadas em microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL de meio YEP (10 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona bacteriológica e 5 g/L de NaCl) a 28°C a 100 rpm por 4 h. As culturas foram transferidas para placas de Petri com meio sólido YEP contendo canamicina (50 mg/mL) e rifampicina (15 mg/mL). Cinco colônias foram isoladas em meio de cultura fresco para a realização da extração de DNA plasmidial (Bimboim & Doly, 1979) e consequente transformação de células de *E. coli* 10Hβ por eletroporação para confirmar por digestão com a enzima de restrição *Hind*III a transformação de *A. tumefaciens*.

Após confirmação dos padrões de restrição, as colônias recombinantes de *A. tumefaciens* foram incubadas em tubos Falcon contendo 5 mL de meio YEP líquido com canamicina e rifampicina a 28°C a 150 rpm por 24 h. Essas culturas foram usadas como pré-inóculo das culturas definitivas a serem utilizadas no *floral dip*.

4.8 Transformação genética de *A. thaliana* por *floral dip* e seleção das linhagens transformadas

Para o preparo da solução de submersão das inflorescências, cerca de 25-50 µL do pré-inóculo (cultura de *A. tumefaciens* contendo os plasmídeos recombinantes pCAMBIA2300/RdRp2-hp, pCAMBIA2300/MET-hp ou pCAMBIA2300/p15-hp a OD₆₀₀ = 0.6) foram utilizados para inocular 200 mL de meio YEP líquido contendo canamicina e rifampicina. As culturas cresceram a 28 °C a 150 rpm por 20 h e, posteriormente, foram centrifugadas por 15 min a 18.000 x g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células de *A. tumefaciens* GV3101 foi ressuspensionado em sacarose 5% até OD_{600nm} = 0.8. O detergente Tween-20 (0,075% v/v) ou Silwet L-77 (0.05% v/v) foram adicionados logo antes da infiltração.

Quando as plantas apresentavam inflorescências com os botões florais ainda fechados (Figura 3), a submersão das mesmas foi realizada na solução de infiltração por 15 s. Em seguida, as plantas foram cobertas com saco plástico por 24 h para conservação de maior umidade. O procedimento foi repetido mais uma vez nos vasos em que as plantas apresentavam muitas flores não abertas (botões florais) após seis dias da primeira submersão. No total duas submersões por vaso foram realizadas (Zhang et al., 2006) e até quatro plantas adultas foram mantidas por vaso. Seguido da submersão, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento por 3-5 semanas até as sílicas ficarem secas. Após a colheita das sílicas, as sementes foram mantidas a 4°C no escuro.



Figura 3: Botões florais de *Arabidopsis thaliana*. O estágio pré-abertura (fechados) é considerado o momento ideal para a realização do *floral dip*.

As sementes foram desinfestadas com álcool 70% por 5 min., hipoclorito de sódio (diluição de 50% da solução comercial Super Cândida, com teor de cloro ativo 2,0% a 2,5%) com Tween-20 (0.02% v/v) por 10 min e lavadas de 5-6 vezes com água Milli-Q estéril (Lindsey et al., 2017). Para a seleção das sementes transgênicas, sua germinação e

o desenvolvimento inicial das plântulas foram avaliadas em meio sólido MS (Murashige & Skoog, Sigma-Aldrich) com ágar (1%) na presença de canamicina (50 mg/mL) (Harrison et al., 2006) na câmara de crescimento (item 4.3). As plântulas resistentes com folhas verdadeiras verdes e raízes bem estabelecidas no meio de seleção foram identificadas entre 7 e 12 dias após a germinação. As plântulas selecionadas foram isoladas em placas de Petri com substrato autoclavado peneirado e suplementado com MS 1/2x diluído em água estéril. Após uma semana, as plântulas foram transplantadas individualmente para vasos.

A eficiência de transformação (ET) de *A. thaliana* pelo método *floral dip* nas condições descritas foi calculada mediante a equação:

$$ET = \frac{\# \text{ de plantas resistentes a canamicina}}{\# \text{ de sementes avaliadas}} * 100$$

4.9 Análise molecular das plantas recombinantes

Duas folhas de cada planta adulta selecionada do meio MS com canamicina (50 mg/mL) foram maceradas em um cadinho com pistilo em presença de nitrogênio líquido (N_{2(l)}). A extração de DNA seguiu o protocolo adaptado de Dellaporta et al. (1983). Brevemente, o tecido vegetal (100 mg) macerado foi incubado com 500 µL de tampão de extração (50 mM EDTA pH 8, 100 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl e 0,07% de β-mercaptoetanol) em um microtubo de 1,5 mL. Após a adição de 70 µL de SDS 10%, a mistura foi incubada a 65 °C por 10 min. Em seguida 130 µL de acetato de potássio 5M foram adicionados e a solução foi incubada no gelo por 5 min até centrifugação a 18.000 x g por 10 min. Para a precipitação do DNA genômico, o sobrenadante foi homogeneizado na presença de 640 µL de isopropanol e 60 µL de acetato de sódio 3M e centrifugado por 10 min a 18.000 x g. O pellet resultante foi lavado com etanol 70% gelado e posteriormente secado a temperatura ambiente. O pellet seco foi ressuspendido em 30 µL de água MilliQ autoclavada contendo RNaseA (10 mg/mL) e a solução foi incubada a 37 °C por 45 min.

Para as análises por PCR, a concentração e a qualidade do DNA vegetal foram verificadas por espectrofotômetro NanoDrop™ 8000 (Thermo Scientific). Todos os ensaios de PCR foram realizados com 100 ng de DNA e com os iniciadores específicos para a detecção dos fragmentos virais presentes nas construções genéticas (Tabela 1). As plantas MET-hp foram analisadas com iniciadores que amplificam um fragmento de 323 pb (Tabela 2). Outras análises incluíram combinações de iniciadores específicos para a

região do promotor 35S do CaMV e do terminador tNos com os iniciadores 5' dos fragmentos virais (Tabela 1) e os do gene *nptII* (Tabela 2). Para confirmar a ausência de *A. tumefaciens* nas plantas adultas obtidas a partir do *floral dip*, iniciadores que amplificam um fragmento de 664 pb do gene *tsz* de *A. tumefaciens* GV3101 foram utilizados (Tabela 2).

Tabela 2: Iniciadores utilizados para a análise molecular por PCR das plantas recombinantes.

Iniciador	Região alvo	Sequência (5'-3')	Referência
35S	Gene 35S	F: CACAATCCCACTATCCTTCG	Ramos-González, não publicado
tNos	Gene <i>tNos</i>	R: CGGCAACAGGATTCAATCTT	Ramos-González, não publicado
NPTII	Gene <i>NPTII</i>	F: GAGGCTATTCGGCTATGACT R: GGCGATGCGCTGCGAATCG	Este trabalho
MET	MET-hp	F:TGTGGTGGGAAGATGGCATTAAAG R: GCCCATTACGACCCTTGAAC	Este trabalho
tsz	Gene <i>tsz</i> de <i>A.</i> <i>tumefaciens</i>	F: TCTGGCCACTGAGG AAAATC R: ATCTACGGACCGACTT GCAG	Han et al., 2013

4.10 Determinação do número de cópias dos transgenes mediante análises fenotípicas

O número de cópias dos transgenes de cada linhagem transgênica identificada foi indiretamente verificado mediante o estudo da segregação mendeliana da geração T₁ em placas com meio MS sólido contendo canamicina (50 mg/mL). As plantas transgênicas T₀ foram mantidas em vasos individualizados e protegidas com um saco de papel para garantir o isolamento das inflorescências e a autofecundação. Assim que as sílicas secaram, as sementes foram coletadas para a realização da assepsia (item 4.8) para posterior seleção.

As plantas da geração T₁ foram classificadas como resistentes quando apresentavam folhas verdadeiras verdes e raízes bem desenvolvidas ou sensíveis à canamicina quando apresentavam as folhas cotiledonares amareladas/sem cor e não desenvolveram folhas verdadeiras. Para avaliar a conformidade da segregação genética com os princípios da herança mendeliana foi realizado um teste qui-quadrado (χ^2) (Bicar, 2009). As hipóteses para o teste foram as seguintes, **H₀**: Não existe diferença significativa

entre os valores observados e os valores esperados sob a lei de segregação mendeliana de características expressas a partir de um gene com cópia única (segregação 3:1); **H₁**: Existe uma distribuição significativamente diferente do esperado (3:1). Uma tabela de contingência foi construída, cruzando as categorias de fenótipo com os valores observados e esperados. O valor do χ^2 foi calculado de acordo com a equação:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

, onde χ^2 é o valor do teste, \sum indica a somatória de todas as células da tabela de contingência, O representa o valor observado em uma célula específica da tabela, e E é o valor esperado para a célula específica da tabela sob a hipótese nula.

O grau de liberdade (df) foi determinado com base no número de categorias (resistente a canamicina e não resistente) menos 1 e o nível de significância foi definido em $\alpha = 0,05$. O valor do χ^2 calculado foi comparado com o valor crítico da distribuição χ^2 para o nível de significância e grau de liberdade avaliado. Uma nova hipótese nula (**H₀**) foi avaliada quando uma distribuição significativamente diferente do esperado para uma única cópia (3:1) foi observada. Neste caso, as hipóteses para o teste foram as seguintes, **H₀**: Não ocorre diferença significativa entre os valores observados e os valores esperados sob a lei de segregação mendeliana de características expressas a partir de um gene com duas cópias (segregação 15:1); **H₁**: Existe uma distribuição significativamente diferente do esperado (15:1).

4.11 Determinação do número de cópias dos transgene mediante qPCR

Para confirmar os resultados obtidos pela segregação mendeliana, o número de cópias dos transgenes também foi verificado por PCR em tempo real (qPCR) com fluoróforos intercalantes. A análise foi conduzida com base no método de $\Delta\Delta C_q$ utilizando o gene *4-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE (4HPPD)* como gene de referência, que possui apenas uma única cópia no genoma de *A. thaliana* (Kanwar et al., 2022). Os iniciadores foram desenhados para a amplificação de regiões do gene *RdRp2* presente em uma das construções finais utilizando o programa PrimerQuest (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA) (Tabela 3). Os iniciadores específicos para a amplificação do gene *4HPPD* foram previamente descritos (Kanwar et al., 2022).

Tabela 3: Iniciadores utilizados para a verificação do número de cópias dos transgenes por PCR em tempo real com fluoróforos intercalantes. Tm = temperatura de melting.

Região alvo	Sequência (5'-3')	Tm (°C)	%GC	Amplicon (pb)
RdRp2-hp	F: TGCCGTACAAAAGCGTAACC	62	50	125
	R: GGACCTCCTGAAAATAGCGCT	63	52	

A curva padrão foi elaborada com o DNA extraído de cada planta avaliada em cinco diluições seriadas de 100 ng/μL até 10 pg/μL. Cada ponto da diluição foi analisado em triplicata. A eficiência (E) de amplificação de cada par dos iniciadores foi calculada utilizando a fórmula:

$$E=10^{(-1/S)}$$

onde S é o valor do declive (*slope*) da reta de melhor ajuste. Os valores de quantificação (Cq) para cada reação foram determinados utilizando Real-Time PCR Miner (Zhao & Fernald, 2005). Todos os ensaios de qPCR foram realizados no 7500 Fast Real-Time PCR System Device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) com os seguintes ciclos térmicos: 95°C, 20 s, 40 ciclos a 95°C for 3 s e 60°C for 30 s. As análises foram feitas utilizando 3 μL de DNA da amostra preparada em diluições seriadas (100 ng/μL, 10 ng/μL, 1 ng/μL, 100 pg/μL e 10 pg/μL), 5 μL da reação do GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA) e iniciadores para uma concentração final de 200 nM. O número de cópias dos transgenes foi calculado segundo o protocolo estabelecido por Kanwar et al. (2022), no qual os valores de declive e intercessão obtidos pelas curvas padrões de melhor ajuste são utilizados na equação:

$$\frac{X}{R} = 10^{\left(\frac{Cx-Ix}{Sx} - \frac{Cr-Ir}{Sr}\right)}$$

onde Cx e Cr representam a média do valor de Cq para o gene *RdRp* e *4HPPD*, respectivamente, para cada linhagem transgênica. Ix, Ir, Sx e Sr representam os valores de intercessão e de declive para os genes *RdRp* e *4HPPD*, respectivamente (Kanwar et al., 2022). Considerando que as linhagens transgênicas da geração T₀ são heterozigotas, o valor de X/R é multiplicado por dois para obter o número de cópias dos transgene (Weng et al., 2004).

4.12 Criação e manutenção de ácaros *Brevipalpus yothersi* virulíferos

Uma população de ácaros *B. yothersi* avirulíferos da isolinha A1 foi obtida a partir de exemplares gentilmente cedidos pela Dr^a. Valdenice Novelli, do Centro de Citricultura

Sylvio Moreira, Cordeirópolis, SP. A população de ácaros virulíferos foram obtidos transferindo membros da população avirulífera para frutos de laranja doce infectados com CiLV-C SJP. Os ácaros foram mantidos nos frutos infectados por um mês e transferidos para frutos sadios a partir de então. Todos os frutos foram previamente lavados com água e detergente (Veggie Wash®) e posteriormente secos. Os ácaros foram mantidos em frutos não maduros de laranja doce numa área de 4-5 cm com uma mistura de farinha de trigo, gesso e areia fina (1:1:2) delimitada por cola entomológica (Rodrigues et al., 2007) em uma sala com fotoperíodo 14 h luz a 25°C.

Para confirmar a presença de CiLV-C SJP nas populações virulíferas, os extratos de RNA total de dez ácaros por fruto foram extraídos com TRizol® (Thermo Scientific, Waltham, EUA). A detecção de CiLV-C por RT-PCR seguiu conforme descrito no item 4.5.

4.13 Ensaio piloto para a avaliação da eficiência de inoculação de CiLV-C por ácaros *Brevipalpus yothersi*

Para avaliar a eficiência de inoculação de CiLV-C e garantir os máximos valores de infecção viral nos desafios das plantas transgênicas, um ensaio piloto foi elaborado com plantas selvagens (WT) e ácaros virulíferos. Os experimentos foram conduzidos com os padrões previamente estabelecidos (Arena et al., 2022). Brevemente, 15 ácaros (cinco ácaros em três folhas) foram transferidos para cada uma de quatro arabis WT. A partir do 7º dia após a infestação, as possíveis variações fenotípicas das plantas foram registradas. A detecção do genoma viral foi realizada como descrito nos itens 4.4 e 4.5.

4.14 Desafio das plantas transgênicas com CiLV-C

Para a avaliação da resistência induzida pelo SGpT, as plantas de diferentes linhas transgênicas foram desafiadas com CiLV-C SJP através da infestação com *B. yothersi* virulíferos. Em cada experimento plantas selvagens foram utilizadas como testemunhas. Após a seleção com antibiótico das plantas da geração T₁ (descrito no item 4.8), as plântulas foram transferidas para placas com substrato peneirado e autoclavado suplementado com MS 1/4 X para aclimatização e, após 7 dias, foram transferidas para vasos individualmente. Após cerca de 3-4 semanas de crescimento, cinco ácaros virulíferos foram transferidas para cada uma de três folhas de cada planta, de acordo com o ensaio piloto (item 4.14). As infestações foram realizadas em folhas com tamanho e

idade aproximadamente similares para garantir o máximo de padronização possível e os ácaros foram mantidos nas plantas até o final do experimento. No total quatro desafios independentes foram conduzidos com plantas transgênicas e selvagens: (i) WT (n=9), RdRp2-hp_39 (n=6), MET-hp_115 (n=9) e MET-hp_117 (n=9); (ii) WT (n=18), RdRp2-hp_70 (n=18), RdRp2-hp_83 (n=16) e MET-hp_109 (n=8); (iii) WT (n=18), p15-hp_88 (n=18), p15-hp_89 (n=18) e RdRp2-hp_92 (n=18); e (iv) WT (n=18), MET-hp_112 (n=18), p15-hp_44 (n=18), p15-hp_69 (n=18) e p15-hp_100 (n=15). Cada folha infestada com ácaros virulíferos foi tratada como uma amostra independente (réplica técnica) nas análises posteriores. Essa estratégia é particularmente válida nos estudos com CiLV-C considerando que a infecção viral não é sistêmica. Esse comportamento implica que cada locus infectivo em diferentes folhas de uma mesma planta, ou até dentro de uma mesma folha, possa ser considerado um ponto de infecção independente.

Após a infestação, o desenvolvimento dos sintomas nas plantas foi registrado diariamente até 12 dias após a infestação (dai). Baseado nos experimentos do ensaio piloto, uma escala diagramática foi construída para caracterizar o nível de lesões observado nas folhas. O nível 1 corresponde a manchas amareladas com aproximadamente 1 mm de diâmetro; nível 2: múltiplas manchas amareladas de 0,5 a 1 cm; nível 3: manchas amareladas com manchas cloróticas em volta com mais de 1 cm; nível 4: folha senescente com ilhas verdes e pontos de necrose (Figura 4). Todas as folhas coletadas foram avaliadas em um microscópio estereoscópico para a retirada dos ácaros presentes antes da análise molecular. No caso de plantas que não apresentaram sintomas ao longo do desafio, a presença do vírus foi avaliada nos ácaros retirados das folhas como descrito no tópico 4.5.

Um gráfico de dispersão foi elaborado a partir do registro diário da progressão dos sintomas nas folhas infestadas ao longo do desafio para avaliar possíveis diferenças no desenvolvimento dos sintomas entre as plantas transgênicas e selvagens em cada experimento. No gráfico foi representada a severidade dos sintomas observados em cada folha infestadas a cada dia do experimento, e o valor do declive da curva de melhor ajuste dos dados foi calculado utilizando o programa R (Team, 2023).

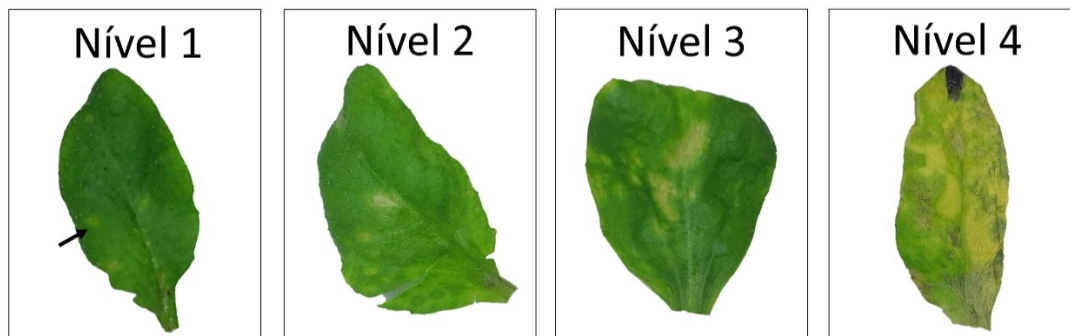


Figura 4: Desenvolvimento das lesões causadas pela infecção por CiLV-C em *A. thaliana* e escala diagramática de notas utilizada nas avaliações dos sintomas durante o desafio das plantas com CiLV-C. Os graus de lesões incluem o nível 1: manchas amareladas ao redor de 1 mm; nível 2: manchas amarelas de 0,5-1 cm com outros pontos de sintomas na folha; nível 3: manchas amarelas acima de 1cm. com manchas cloróticas ao redor; e nível 4: folhas senescentes com pontos verdes espalhados e começo de necrose em alguns pontos.

4.15 Avaliação da acumulação viral após o desafio

4.15.1 Extração de RNA total livre de DNA e síntese de cDNA

O RNA total de cada folha infestada com ácaros foi extraído com protocolo estabelecido para a extração de RNA livre de DNA de tecidos vegetais de arabis (Oñate-Sánchez et al., 2008). Cerca de 30 mg de tecido foliar foi macerado em cadinho com pistilo na presença de nitrogênio líquido ($N_{2(l)}$) na presença de 300 μ L da solução de lise (2% SDS, 68 mM citrato de sódio, 132 mM ácido cítrico, 1 mM EDTA). Após a transferência do tecido macerado para um microtubo de 1,5 mL, adicionou-se 100 μ L da solução de precipitação de proteína e DNA (4 M NaCl, 16 mM citrato de sódio, 32 mM ácido cítrico) e as amostras foram incubadas a 4 °C por pelo menos 10 min. Após centrifugação a 18.000 x g a 4 °C por 10 min, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo com 300 μ L de isopropanol e centrifugado por 4 min a 18.000 x g. O pellet foi lavado com etanol 70% gelado, seco e ressuspendido em 25 μ L de água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato, 0,1%). O RNA foi digerido com 2 μ L (2 U) de DNase I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) em presença do tampão DNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) por 30 min a 37°C. Após a digestão, 70 μ L de água foram adicionados aos 30 μ L de RNA digerido, 50 μ L de 3 M acetato de sódio e 400 μ L de etanol 100%. Os microtubos foram centrifugados por 20 min a 4 °C, o pellet lavado com etanol 70% gelado, seco e ressuspendido em 20 μ L de água tratada com DEPC. A

concentração e a pureza do RNA (Ratio_{260/280}) foram determinadas com NanoDrop ND-8000 espectrofotômetro (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

A síntese de cDNA foi realizada com 250 ng de RNA com o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega, Madison, EUA), como descrito no item 4.4.2. Os cDNAs sintetizados foram utilizados nos ensaios de qPCR numa diluição de 1:6 (1 µL de RNA e 5 µL de água estéril).

4.15.2 Análise da acumulação viral por qPCR

Para as análises da acumulação viral por PCR quantitativo (qPCR), o gene *SAND* (família *SAND*, AT2G28390) de arábidoopsis foi utilizado como gene de referência para padronização do experimento, como previamente estabelecido para estudar a interação arábidoopsis/CiLV-C (Arena et al., 2016, 2022). Dois pares de iniciadores para o gene *SAND* foram avaliados para determinar o mais adequado para utilizá-lo com fluoróforos intercalantes (Tabela 4). Para a análise dos diferentes iniciadores os seguintes extratos foram utilizados: (1) RNA tratado com DNaseI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), (2) RNA sem tratamento com DNaseI, (3) cDNA sintetizados a partir do extrato de RNA obtido em (1), (4) cDNA sintetizados a partir do extrato de RNA obtido em (2) e (5) DNA genômico. Com exceção dos cDNAs, as amostras foram padronizadas numa concentração de 100 ng/µL. Os cDNAs foram preparados como mencionado no item 4.13.1. O mix de qPCR foi composto por 5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 3 µL das amostras e 500 nM dos iniciadores em um volume de reação total de 10 µL no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). As amostras foram analisadas em triplicata e as reações foram conduzidas nos seguintes ciclos: 95 °C por 20 s (1x); 95 °C por 5 s e 60 °C por 30 s (40x). Uma etapa extra para análise da curva de *melting* foi incluída a 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min, 95 °C por 15 s e 60 °C por 15 s. Uma vez determinado o jogo de iniciadores mais adequado, uma curva padrão foi estabelecida com o cDNA de arábidoopsis não infectada numa concentração inicial de 60 ng/µL seguida de uma diluição seriada de 1:10 (10¹ a 10⁵). A eficiência de amplificação dos ensaios de qPCR foi determinada como descrito no item 4.12.

Tabela 4: Iniciadores e sonda utilizados nas análises por PCR quantitativo da acumulação viral após o desafio das plantas transgênicas.

Gene alvo	Sequência (5'-3')	Reporter (5') e Quencher (3')	Referência
<i>A. thaliana</i> <i>SAND</i>	F: AGGATTGGGACCCCACAAGA R: TATCGCCATCGCCTTGTCTG	NA	(Beatrice et al., 2022)
	F: CAGACAAGGCCATGGCGATA R: GCTTTCTCTCAAGGGTTTCTGGGT	NA	(Hong et al., 2010)
<i>RdRp</i> de CiLV-C SJP	F: TGTTAAGGCTGGTCTC S: AAGTCATGTGCGGTTGGCA R: GATCCACGAGACGTT	HEX/BHQ-1	(Barro, 2022)

NA – Não se aplica.

A acumulação do CiLV-C foi avaliada por qPCR com sondas de hidrólise e iniciadores que amplificam o gene *RdRp* do RNA1 de CiLV-C SJP com sistema previamente estabelecido (Barro, 2022). A qPCR foi realizada com 5 µL do GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega, Madison, EUA), 3 µL do cDNA diluído (1:5), 250 nM das sondas de hidrólise e 200 nM dos iniciadores específicos (Tabela 3) em um volume de reação total de 10 µL no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). As amostras foram analisadas em duplicatas e controles apenas com água (sem amostra) foram incluídos. A reação foi realizada com os seguintes ciclos: 95°C por 20 s (1x); 95°C por 5 s e 60°C por 30 s (40x). As reações para normalização com o gene *SAND* foram realizadas com fluoróforos intercalantes e foram conduzidas como mencionado no parágrafo anterior. Os valores de Cq de cada amostra foram calculados com o programa 7500 software®.

Para determinar a diferença na acumulação viral entre as amostras de plantas selvagens e aquelas das linhas transgênicas, a seguinte fórmula foi seguida:

$$\text{Redução percentual} = \frac{\text{Quantificação média WT} - \text{Quantificação média T}}{\text{Quantificação média WT}} \times 100,$$

onde WT indica os valores obtidos a partir das plantas selvagens sendo utilizada como padrão do experimento e T indica os valores das amostras de uma única linhagem transgênica.

4.16 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa R (Team, 2023). O teste Bartlett complementado com Shapiro Wilk foi realizado para verificar a

homocedasticidade e distribuição normal das amostras. Os testes Kruskal-Wallis e Dunn foram empregados como uma alternativa não paramétrica ao ANOVA e Tukey's HSD com $p < 0,05$ para determinar a diferença estatística entre os grupos de dados, uma vez que as amostras não demonstraram distribuição normal. As comparações estatísticas foram realizadas entre os diferentes grupos de cada experimento.

5 RESULTADOS

5.1 Construções genéticas para a indução do silenciamento gênico contra o CiLV-C em *Arabidopsis thaliana*

Uma vez que a linhagem SJP de CiLV-C é a prevalente na principal região produtora de laranja doce do Brasil (Chabi-Jesus et al., 2021), as construções foram feitas com base em sua sequência. No entanto, com o intuito de realizar construções com possibilidade de atingir todas as estirpes conhecidas do vírus, as regiões mais conservadas (maior identidade) entre as três estirpes de CiLV-C foram identificadas. A partir dos perfis de identidade de nucleotídeos entre os RNA1 e RNA2 das estirpes, as regiões com os maiores valores foram selecionadas para desenvolver as construções genéticas para estimular o SGpT (Figura 5).

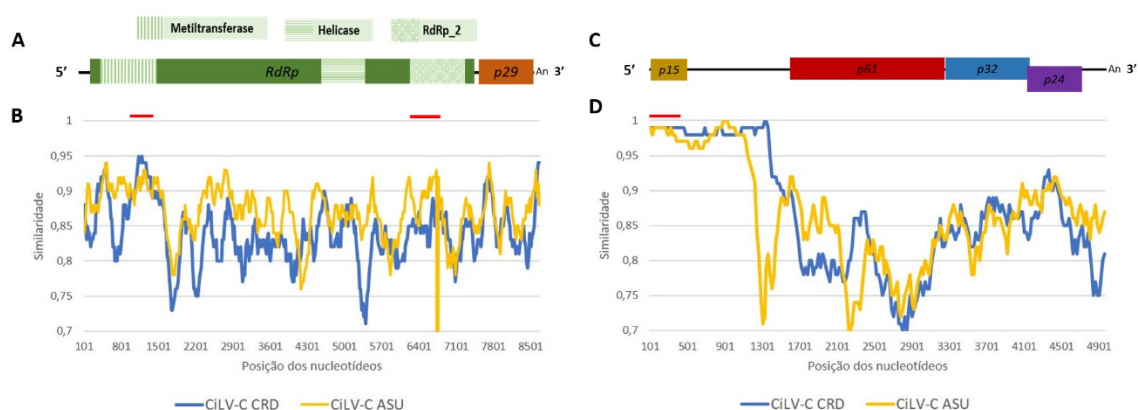


Figura 5: Análise do perfil de identidade entre as estirpes SJP, CRD e ASU de CiLV-C. Traços vermelhos indicam a posição das sequências escolhidas como alvo do silenciamento gênico. **A.** Representação linear do RNA1 de CiLV-C, mostrando as posições dos genes *RdRp* e *p29*. Acima estão indicados os domínios do gene *RdRp*. **B.** Perfil de identidade do RNA1 de SJP (KP336746) com aqueles das estirpes CRD (NC008169) e ASU (MT554532). **C.** Representação linear do RNA2 de CiLV-C, mostrando as posições dos genes *p15*, *p61*, *p32* e *p24*. **D.** Perfil de identidade do RNA2 de SJP (KP336747) com os das estirpes CRD (NC008170) e ASU (MT554546). As plotagens foram realizadas utilizando o programa Simplot versão 3.5.1.

Através da análise do perfil de identidade de nucleotídeos entre as três estirpes de CiLV-C, três regiões do genoma de CiLV-C SJP foram escolhidas por serem extremamente conservadas (90%, 86% e 98%, respectivamente). São elas, as sequências dos motivos MET (metiltransferase) e RdRp2 do gene *RdRp* do RNA1, e uma sequência do gene *p15* do RNA2. Os fragmentos virais amplificados por PCR foram inseridos no vetor pHairpin no sentido senso e antisenso (Figura 6^a, Figura Suplementar 1) e, posteriormente, as unidades de transcrição englobando p35s/antisenso-ítron-senso/Nos-terminador correspondentes a cada fragmento viral foram removidas do pHairpin e introduzidas no vetor binário pCAMBIA2300 (Figura 6B, Figura Suplementar 1). Após a confirmação com enzimas de restrição e por sequenciamento, células de *A. tumefaciens* estirpe GV3101 foram transformadas com as construções finais pCAMBIA2300/RdRp2-hp, pCAMBIA2300/MET-hp e pCAMBIA2300/p15-hp para a transformação genética de *A. thaliana* por *floral dip*.

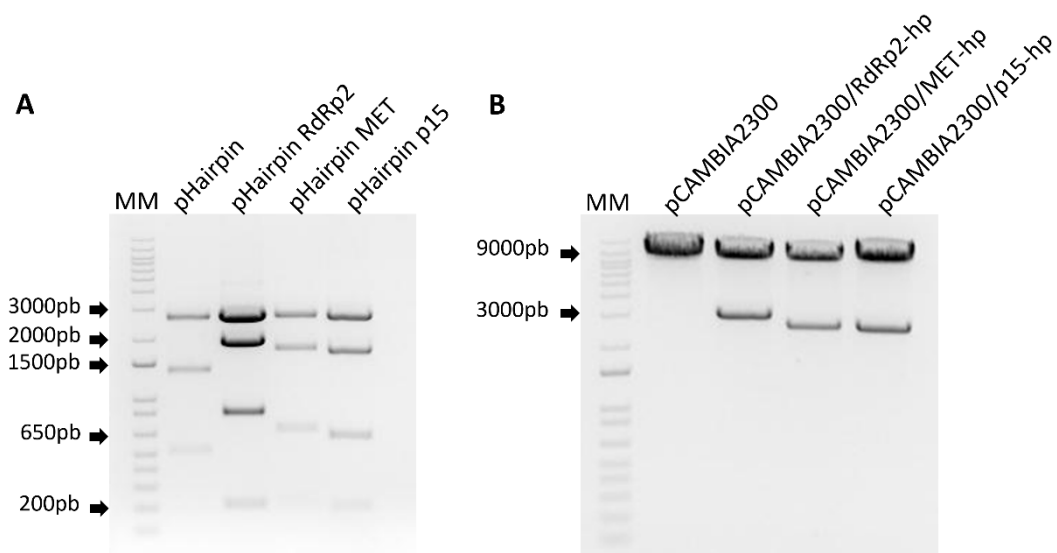


Figura 6: Géis de agarose (1%) com os perfis de restrição das construções genéticas para a indução do silenciamento gênico contra o CiLV-C. Os plasmídeos foram incubados com uma combinação de enzimas de restrição. As construções finais foram montadas com o vetor binário pCAMBIA2300. MM - Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). **A.** Digestão dupla dos plasmídeos recombinantes com *HindIII* e *BamHI*. **B.** Digestão das construções finais com *PstI*.

5.2 Eficiência teórica e identificação de alvos dos siRNAs derivados dos fragmentos virais nas construções genéticas para a indução do silenciamento

O número de siRNAs totais (com alta identidade nucleotídica) e siRNAs eficientes (potencialmente efetivos) derivados das sequências virais nas construções genéticas foi

estimado contra o genoma das três estirpes de CiLV-C: SJP, CRD e ASU. Com uma média de 25 siRNAs, o fragmento RdRp2 gerou o menor número de siRNAs eficientes contra os genomas das estirpes CRD e ASU (Figura 7). Com o fragmento MET-hp se detectou um número maior de siRNAs eficientes nas análises com os genomas de SJP e CRD (Figura suplementar 2). O fragmento do gene *p15* gerou o maior número de siRNAs totais e eficientes contra o genoma das três estirpes, com uma média de 216 siRNAs (Figura suplementar 3). Em análises similares não foram identificados possíveis siRNAs gerados a partir das sequências de CiLV-C que pudessem atingir os genomas dos cilevírus PfGSV e CiLV-C2.

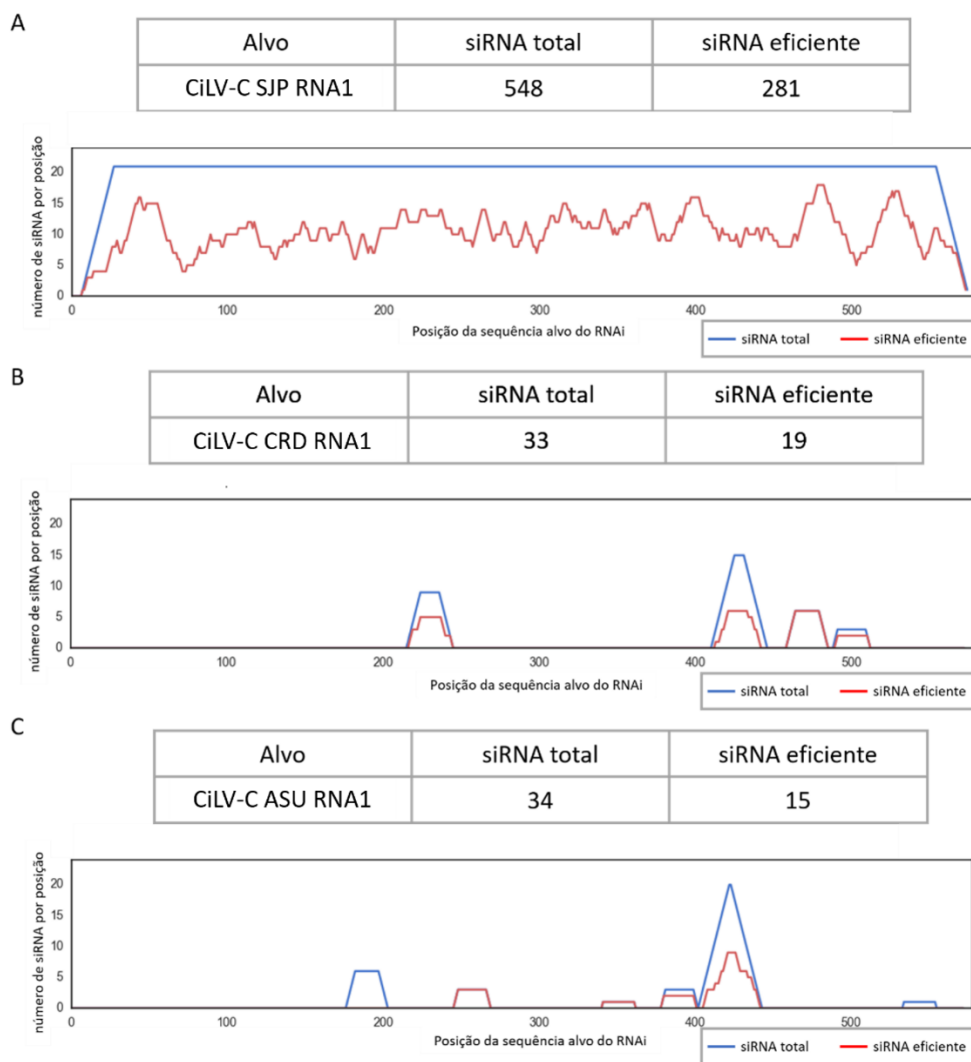


Figura 7: Análise *in silico* do fragmento RdRp2-hp de CiLV-C pelo programa si-Fi (siRNA-Finder) (Lück et al., 2019). Na coluna Alvo está indicado o número de acesso da sequência em análise. **A.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA1 da estirpe SJP. **B.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA1 da estirpe CRD. **C.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA1 da estirpe ASU.

Para aprofundar na análise dos possíveis siRNAs gerados a partir das sequências de CiLV-C SJP a serem incluídas nas construções genéticas, foi conduzido *in silico* uma análise com a ferramenta dsCheck. O software permite identificar possíveis alvos não específicos (*off-target*) no genoma de alguns organismos, entre eles a planta arabidopsis. Uma série de possíveis alvos não específicos com 1-2 *mismatches* foram identificados em alguns *loci* do genoma vegetal, que poderiam ser suscetíveis ao silenciamento gênico (Tabela Suplementar 1, 2 e 3). No entanto, com análises mais restritivas, que incluíram a ausência de *mismatches*, não foram identificados possíveis alvos dos siRNAs. Um segundo programa que estima a eficiência dos siRNAs detectados, o si-Fi, foi utilizado para as análises *in silico*. Nenhum siRNA eficiente foi identificado pelo si-Fi no genoma de arabidopsis e de laranjeira doce. Já no genoma de *B. yothersi* um único siRNA eficiente foi identificado na região scaffold306 com o fragmento RdRp2 (Figura 8).

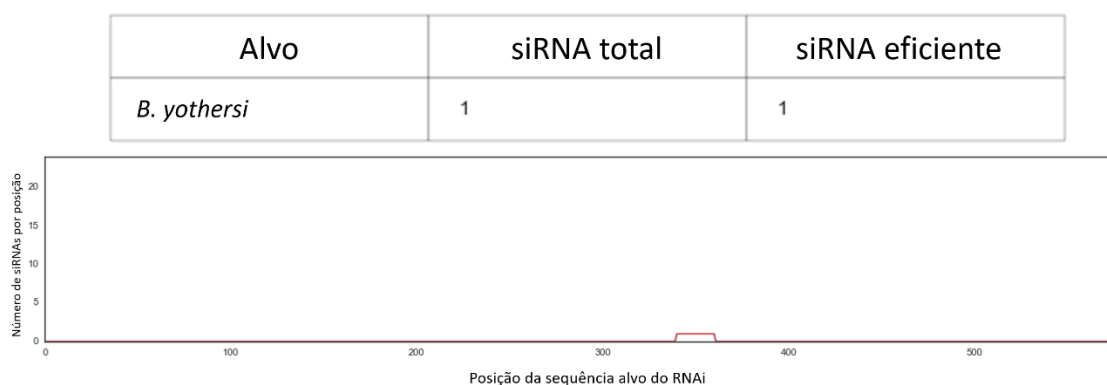


Figura 8: Análise *in silico* do fragmento RdRp2 de CiLV-C pelo programa si-Fi (siRNA-Finder) contra o genoma de *B. yothersi*.

5.3 Linhagens transgênicas obtidas através do *floral dip*

Plantas transgênicas de arabidopsis foram obtidas através do método *floral dip* (Zhang, 2006). A infiltração utilizando Tween-20 na solução de submersão foi repetida vinte e oito vezes no total com as construções RdRp2-hp e p15-hp. Das cerca de 6.000 sementes analisadas em meio MS com canamicina (50 mg/mL), nenhuma resultou em plantas com folhas verdadeiras. Em contraste, com a substituição do Tween-20 pelo Silwet L-77 na solução de submersão, trinta e oito plantas transgênicas (linhagens) foram obtidas no total, o que representa uma média de eficiência de transformação de 0,26% (Figura 9), através de 24 repetições do *floral dip*.

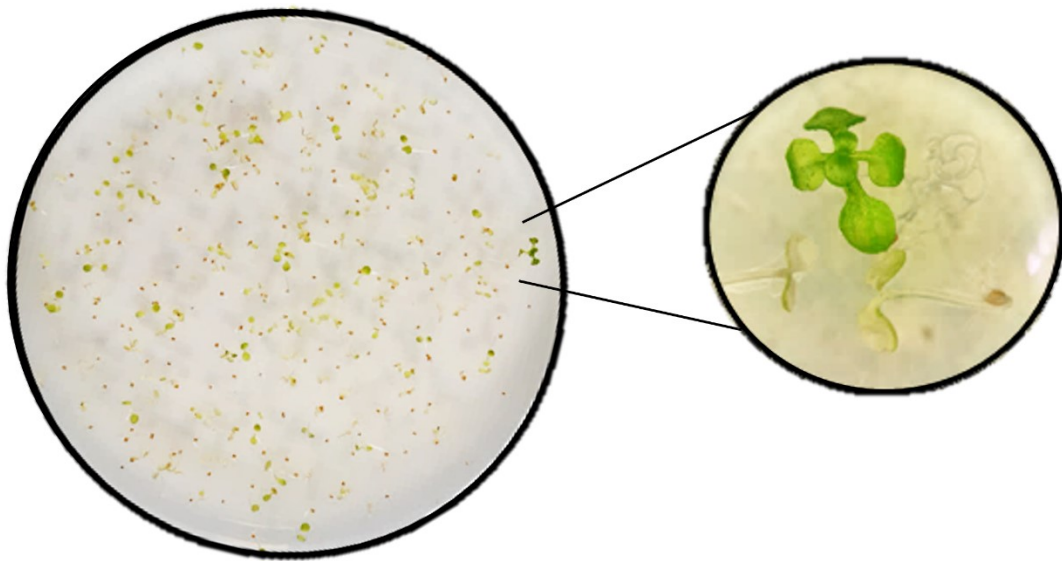


Figura 9: Seleção de eventos transgênicos de RdRp2-hp através da germinação de sementes de *A. thaliana* em meio MS (Murashige e Skoog, MES e ágar (0,8%) com canamicina (50 mg/mL). Uma região da placa evidenciando a diferença entre plantas resistentes e sensíveis ao antibiótico foi destacada. Cerca de 200 sementes foram semeadas por placa de seleção.

A partir de 10.400 sementes de RdRp2-hp, cerca de 0,21% renderam plantas com folhas verdadeiras verdes. Com as construções p15 e MET-hp, das 9.720 e 3.020 sementes coletadas, 0,07% e 0,49% produziam plantas resistentes ao antibiótico, respectivamente (Figura 9). Com as construções RdRp2-hp e p15-hp foram obtidas 22 (Figura suplementar 4) e 7 (Figura suplementar 5) plantas transgênicas, respectivamente (Figura 10A e C). Com a construção MET-hp, 16 plantas foram obtidas (Figura 10B; Figura suplementar 6).

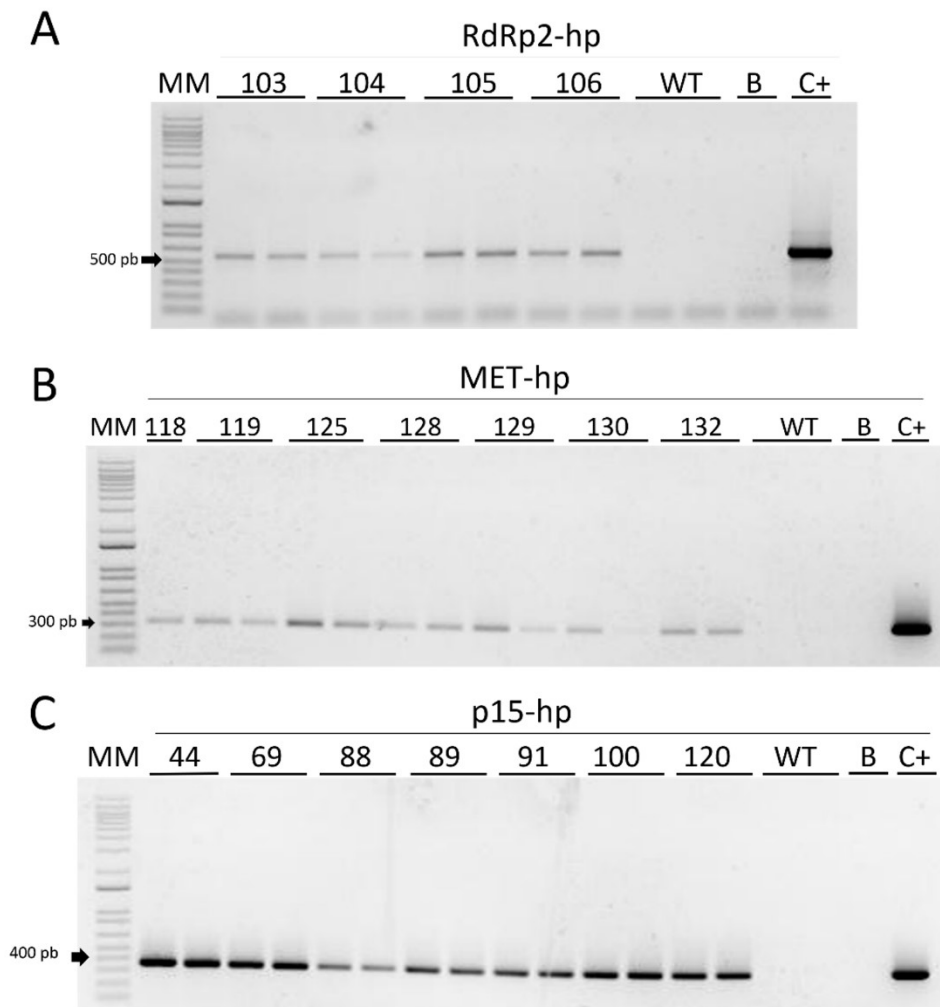


Figura 10: Géis de agarose (0,8%) mostrando a análise feita por PCR das plantas resistentes ao antibiótico canamicina. MM: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). Números anotados em cima do gel indicam a identificação de cada linhagem transgênica. Cada planta foi analisada em duplicata. WT: arabidopsis selvagem (controle negativo). B: branco da PCR. C+: plasmídeo pCAMBIA2300 com os fragmentos virais de cada construção. **A.** PCR realizada com iniciadores para amplificação de um fragmento do gene RdRp2-hp de 567 pb. **B.** PCR realizada com iniciadores para amplificação de um fragmento do gene MET-hp de 323 pb. **C.** PCR realizada com iniciadores para amplificação de um fragmento do gene p15-hp de 370 pb.

As análises realizadas por PCR com iniciadores para o gene *nptII* evidenciaram amplicons com o tamanho esperado ao redor de 789 pb (Figura 11) em todas as plantas avaliadas. Já com os iniciadores para detecção de *A. tumefaciens* nenhum amplicon foi observado (Figura suplementar 7).

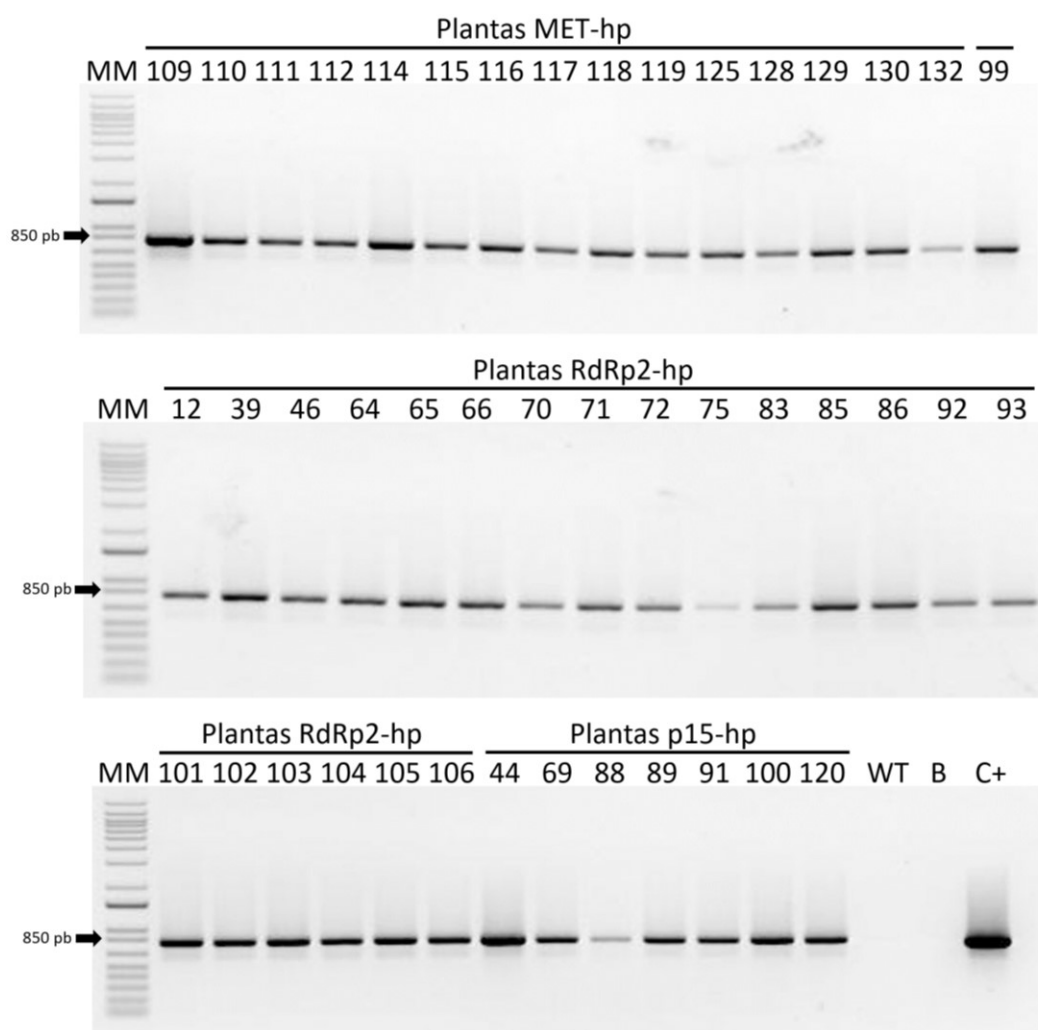


Figura 11: Géis de agarose (0,8%) de ensaios de PCR feitos com iniciadores que amplificam um fragmento de 798 pb do gene *nptII* das diversas construções avaliadas. MM: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). WT: arabis selvagem (controle negativo). B: branco da PCR. C+: controle positivo (plasmídeo pCAMBIA2300).

5.4 Segregação mendeliana dos transgenes e quantificação do número de cópias na geração T₁ mediante avaliação do desenvolvimento das plântulas em meio de seleção

O número de cópias dos transgenes foi avaliado através da segregação mendeliana nas plantas da geração T₁ que foram aleatoriamente selecionadas para os experimentos de desafio. As sementes foram selecionadas em meio MS suplementado com canamicina (Figura 12).

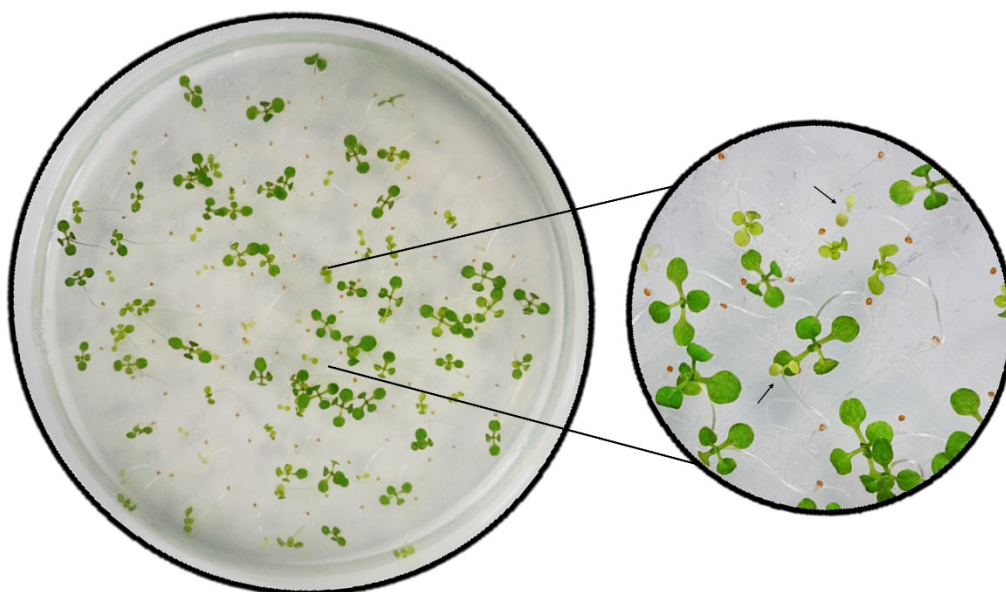


Figura 12: Germinação de sementes da geração T₁ da planta RdRp2-hp_12 em meio MS com canamicina (50 mg/mL). As setas indicam uma planta resistente ao antibiótico (folhas verdadeiras e verdes) e uma planta sensível não transgênica (plântulas amareladas, sem ou com pouco desenvolvimento das folhas verdadeiras).

Os valores da proporção fenotípica observados foram comparados com os valores teóricos esperados considerando a presença de uma cópia do transgene (3:1) (Tabela 5). Os dados observados e teóricos foram processados mediante o teste qui-quadrado (χ^2) e avaliados de acordo com as hipóteses nulas descritas no item 4.9.

Tabela 5: Tabela de contingência elaborada para análise da segregação mendeliana nas plantas transgênicas da geração T₁.

Linha transgênica	Fenótipo	Valor observado	Valor esperado (3:1)	Valor χ^2	P (<0,05)
RdRp2-hp_12	Resistente a canamicina	68	67,5	0,0148	0,9
	Não resistente a canamicina	22	22,5		
RdRp2-hp_39	Resistente a canamicina	16	15,75	0,01	0,9
	Não resistente a canamicina	5	5,25		
RdRp2-hp_70	Resistente a canamicina	21	20,25	0	>0,95
	Não resistente a canamicina	6	6,75		
RdRp2-hp_83	Resistente a canamicina	18	18,75	0,04	0,9

	Não resistente a canamicina	6	6,25		
RdRp2-hp_92*	Resistente a canamicina	34	28,5	5,5	Hipótese nula rejeita
	Não resistente a canamicina	3	9,5		
MET-hp_109	Resistente a canamicina	68	67,5	0,01	0,9
	Não resistente a canamicina	22	22,5		
MET-hp_112	Resistente a canamicina	46	44,25	0,14	0,9
	Não resistente a canamicina	13	14,75		
MET-hp_115	Resistente a canamicina	29	28,5	0	>0,95
	Não resistente a canamicina	9	9,5		
MET-hp_117	Resistente a canamicina	28	28,5	0,01	0,9
	Não resistente a canamicina	10	9,5		
p15-hp_44	Resistente a canamicina	35	37,5	0,6	0,9
	Não resistente a canamicina	15	12,5		
p15-hp_69	Resistente a canamicina	31	31,5	0,01	0,9
	Não resistente a canamicina	11	10,5		
p15-hp_88	Resistente a canamicina	18	18,75	0,06	0,9
	Não resistente a canamicina	7	6,25		
p15-hp_89	Resistente a canamicina	22	23,25	0,139	0,9
	Não resistente a canamicina	7	7,75		
p15-hp_100	Resistente a canamicina	33	33,75	0,04	0,9
	Não resistente a canamicina	12	11,25		

Marcadas com * são as plantas que apresentaram distribuição significativamente diferente do esperado.

O resultado do teste χ^2 sugere que não há diferença significativa entre os valores observados e os valores esperados para a maioria das linhas, pelo que é aceita a hipótese nula descrita no item 4.10, ou seja, apresentam segregação fenotípica 3:1. Apenas a planta RdRp2-hp_92 demonstrou uma proporção observada significativamente diferente do esperado e, portanto, um novo teste, postulando a presença de duas cópias (15:1) foi realizado. Nesse caso, não houve diferença significativa entre os valores observados e os valores esperados (15:1), demonstrando que a planta RdRp2-hp_92 possui duas cópias do transgene ($\chi^2 = 0,2726$, $p = 0,9$).

5.5 Quantificação do número de cópias dos transgene na geração T₁ mediante PCR quantitativo

Como alternativa molecular à avaliação fenotípica, o número de cópias dos transgenes foi determinado por PCR quantitativo (qPCR). As curvas padrões das linhagens RdRp2-hp_70 e RdRp2-hp_92 apresentaram um coeficiente de determinação de 0,99 e a eficiência de amplificação ficou entre 0,81-1,01 (Figura 13).

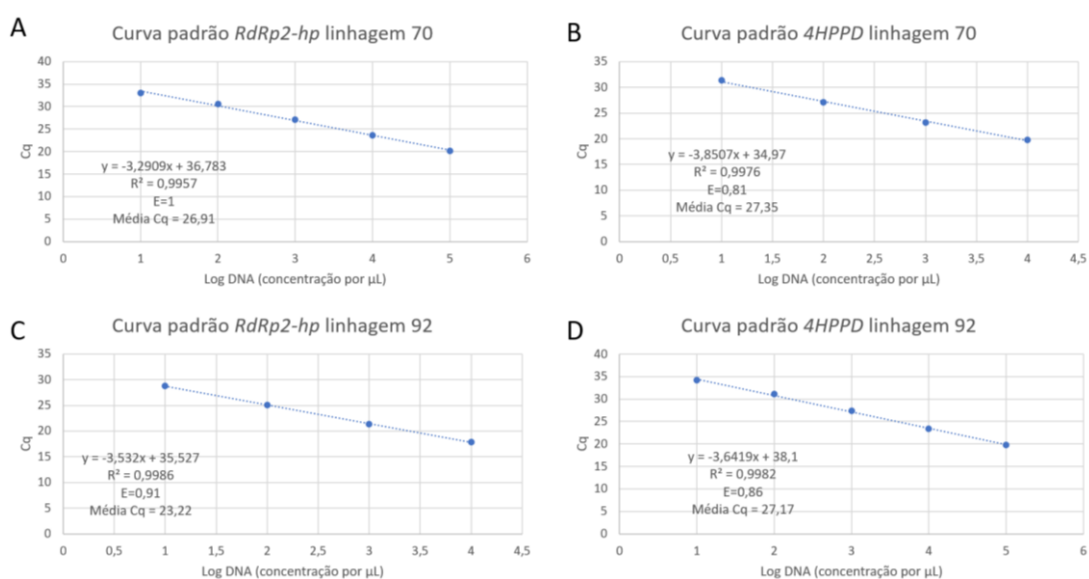


Figura 13: Curva padrão elaborada com os valores de Cq das linhagens transgênicas avaliadas. **A e B.** Curvas padrões para RdRp2 e 4HPPD (gene de referência de *A. thaliana*) da linhagem RdRp2-hp_70. **C e D.** Curvas padrões para RdRp2 e 4HPPD da linhagem RdRp2-hp_92. As curvas foram obtidas a partir da diluição seriada do DNA genômico extraído das plantas (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg e 1 pg). Y = valor de intercessão. R^2 = coeficiente de determinação. E = eficiência de amplificação.

Com os valores de declive e intercessão das curvas ajustadas, o valor obtido de X/R foi de dois para as duas linhagens avaliadas. Considerando que os iniciadores utilizados

amplificam o fragmento viral presente em duplicata nas construções, o resultado indica que as duas linhagens de RdRp2-hp possuem uma cópia dos transgenes.

5.6 Estabelecimento de experimentos pilotos para o desafio das plantas transgênicas

Para o desafio das plantas transgênicas foi necessário desenvolver uma população de ácaros *B. yothersi* virulíferos com CiLV-C SJP. Assim foi realizado um experimento piloto de inoculação e a avaliação dos iniciadores para o gene normalizador para as avaliações de carga viral mediante qPCR.

A presença de CiLV-C na população de *B. yothersi* foi realizada em grupos de dez ácaros por fruto, mediante RT-PCR e em intervalos de 1 mês (Figura 14).

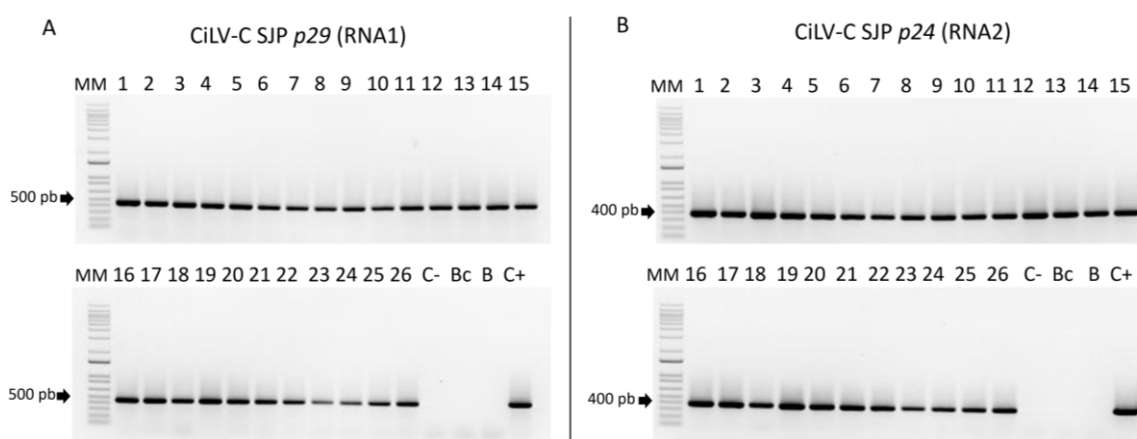


Figura 14: Gel de agarose (0,8%) dos resultados da RT-PCR realizada para detecção de CiLV-C SJP em *B. yothersi* virulíferos. **A.** Iniciadores que amplificam uma região de 456 pb do gene *p29* do RNA1. **B.** Iniciadores que amplificam uma região de 393 pb do gene *p24* do RNA2. MM: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). 1-26: ácaros virulíferos (10 ácaros por fruto). C-: controle negativo (*B. yothersi* avirulífero). Bc: branco da síntese de cDNA. B: branco da PCR. C+: controle positivo (fruto de laranja doce infectado com CiLV-C SJP).

Com a população virulífera de ácaros *B. yothersi* foi conduzido um protocolo de infestação em arabis selvagem para garantir 100% de inoculação de CiLV-C tomando como base trabalhos anteriores (Arena et al., 2022). A avaliação do experimento piloto foi realizada através da observação da evolução dos sintomas (Figura 15A) e a confirmação da presença viral mediante RT-PCR (Figura 15B). Os resultados indicaram que todas as plantas foram inoculadas, atingindo 100% de eficiência de inoculação. Também foram observados em folhas além das inicialmente infestadas, indicando que os ácaros se movimentaram das folhas iniciais para outras regiões das plantas. A análise dos

diferentes pares de iniciadores para o gene *SAND* revelou o mais adequado para normalização dos dados obtidos por qPCR, com base na amplificação seletiva de DNA derivado de RNA (cDNA), em oposição ao DNA genômico (Figura Suplementar 8). Posteriormente determinou-se a eficiência dos iniciadores para o gene *SAND* com fluoróforos intercalantes ($E=0.95$, Figura suplementar 9), permitindo a condução das análises por qPCR com sondas de hidrólise das amostras obtidas do desafio.

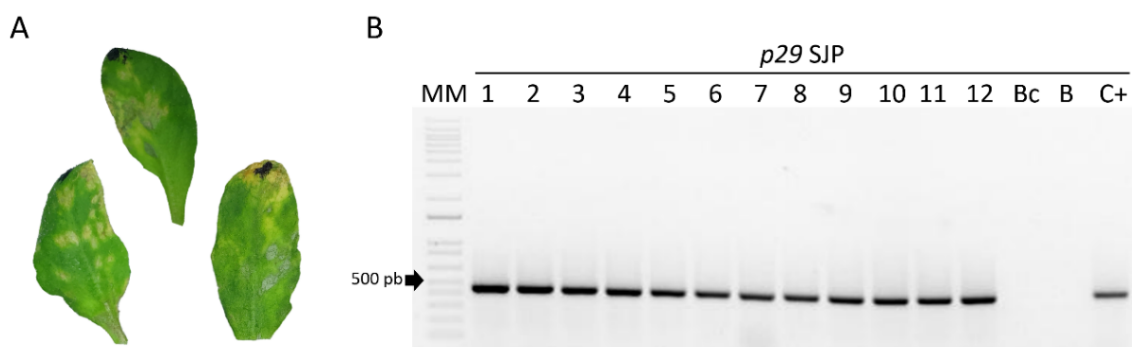


Figura 15: Análise do ensaio piloto em *A. thaliana* selvagem infestadas com ácaros *Brevipalpus yothersi* virulíferos para verificação da eficiência de inoculação. **A.** Folhas de arabidopsis com sintomas na forma de manchas cloróticas e necróticas. **B.** Gel de agarose (0,8%) da RT-PCR realizada com iniciadores que amplificam um fragmento de 456 pb do gene *p29* do CiLV-C SJP. MM: Marcador molecular 1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). 1-12: amostras de arabidopsis (folhas infestadas com ácaros virulíferos). Bc: branco do cDNA. B: branco da PCR. C+: controle positivo (fruto de laranja doce com CiLV-C SJP).

5.7 Redução da carga viral nas plantas transgênicas inoculadas com CiLV-C

No total treze linhagens transgênicas com plantas da geração T₁ foram desafiadas com CiLV-C. A capacidade das plantas transgênicas de resistir à infecção em comparação com as plantas selvagens foi avaliada quanto ao desenvolvimento dos sintomas (Figura 16) e à acumulação viral (Figura 17). Quatro experimentos independentes foram realizados, cada um deles com diferente composição de linhagens transgênicas. A realização do experimento de forma escalonada foi necessária principalmente devido ao reduzido espaço disponível na câmara de crescimento de plantas Conviron.

Em algumas linhagens transgênicas foi possível observar uma lenta progressão da severidade dos sintomas, e menor severidade dos mesmos ao longo dos experimentos (Figura 16). A comparação do valor de declive (*slope*) das curvas de melhor ajuste dos gráficos de severidade permitiu detectar a diferença no desenvolvimento dos sintomas

entre as plantas WT e transgênicas no desafio 1. Enquanto as linhagens RdRp2-hp_39 e MET-hp_115 tiveram um valor de declive similar à WT de 0,54, 0,5 e 0,67, respectivamente, a linha MET-hp_117 teve um valor de declive menor, de apenas 0,3 (Figura 16A). No segundo desafio a linha RdRp2-hp_70 não desenvolveu sintomas (Figura 16, B; Figura suplementar 9) e, portanto, teve um valor de declive de 0. As linhas de tendência que representam as linhagens RdRp-hp_83 e MET-hp_109 tiveram um valor de declive de 0,17 e 0,35, respectivamente (Figura 16B). No terceiro desafio as linhas avaliadas WT, RdRp-hp_92, p15-hp_88 e p15-hp_89 tiveram um valor de declive de 0,42, 0,21, 0,41 e 0,48, respectivamente (Figura 16C). No quarto desafio, a linha WT teve um valor de declive de 0,56 e as linhas transgênicas MET-hp_112, p15-hp_44, p15-hp_69 e p15-hp_100, de 0,48, 0,46, 0,41 e 0,32, respectivamente (Figura 16D).

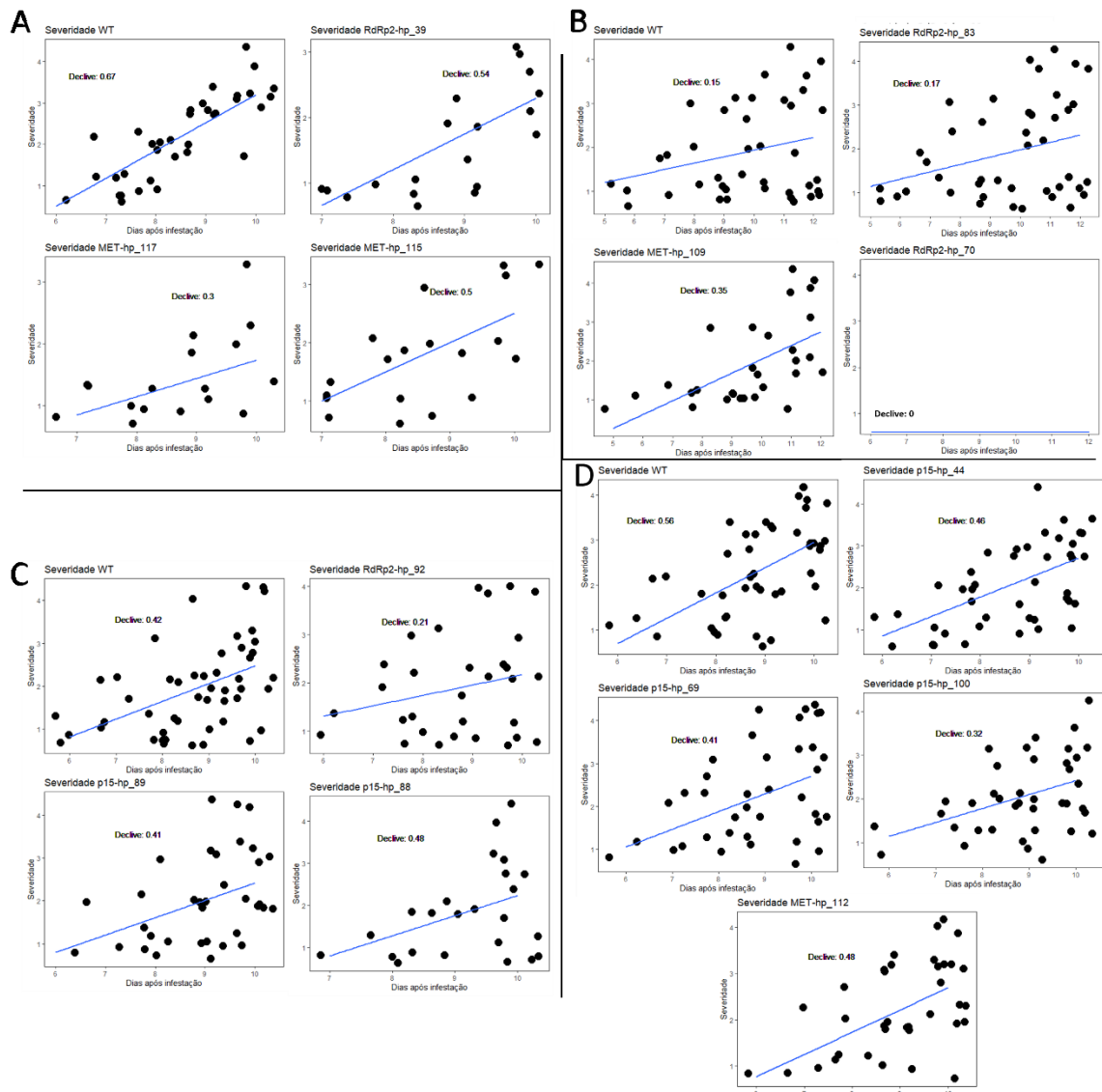


Figura 16: Desenvolvimento dos sintomas após a infestação com ácaros virulíferos das plantas transgênicas e selvagens durante os desafios com CiLV-C. Os gráficos mostram a dispersão da severidade de acordo com uma escala diagramática de notas ao longo do desafio. A linha azul representa a curva de tendência e próximo a ela o valor do seu declive. A linhagem em análise está indicada no título de cada gráfico. Eixo x: dias após infestação. Eixo y: Severidade dos sintomas. Cada ponto preto representa uma folha. **A.** Primeiro desafio. **B.** Segundo desafio. **C.** Terceiro desafio. **D.** Quarto desafio.

No primeiro desafio, as análises através de RT-qPCR revelaram uma redução na carga viral nas linhagens transgênicas RdRp2-hp_39, MET-hp_115 e MET-hp_117 de 70%, 61% e 76,6%, respectivamente, em comparação com a carga viral de $6,51E+07 \pm 1,41E+07$ (\pm Erro Padrão) detectada nas plantas selvagens (Tabela suplementar 4, Figura 17A). A redução na carga viral nas linhas RdRp2-hp_70, RdRp2-hp_83 e MET-hp_109 foi de 100%, 93,1% e 96,6%, respectivamente, em relação à carga viral nas plantas

selvagens do segundo experimento (Tabela suplementar 4, Figura 17B). No terceiro desafio realizado, na comparação com as plantas selvagens, as cargas virais das linhas RdRp2-hp_92, p15-hp_88 e p15-hp_89 foram de 99%, 35,8% e 94,5% menores, respectivamente (Tabela suplementar 4, Figura 17C). No último experimento realizado, as linhas MET-hp_112, p15-hp_44 e p15-hp_69 tiveram uma redução na carga viral em comparação com as plantas selvagens de 14,4%, 87,9% e 92%, respectivamente, enquanto uma linha teve um aumento na carga viral de 16% acima da observadas nas plantas transgênicas, usadas como controle suscetível (Tabela suplementar 4, Figura 17D). A carga viral observada nas linhas RdRp2-hp_70, 83 e 92, MET-hp_117 e 109 e p15-hp_89, 44 e 100 foi significativamente menor do que a detectada nas plantas selvagens de seus respectivos desafios. Nas linhagens transgênicas RdRp2-hp_39, MET-hp_115 e 112 e p15-hp_88 e 100 não houve diferença estatística com as plantas selvagens ($p < 0,05$) (Figura 17).

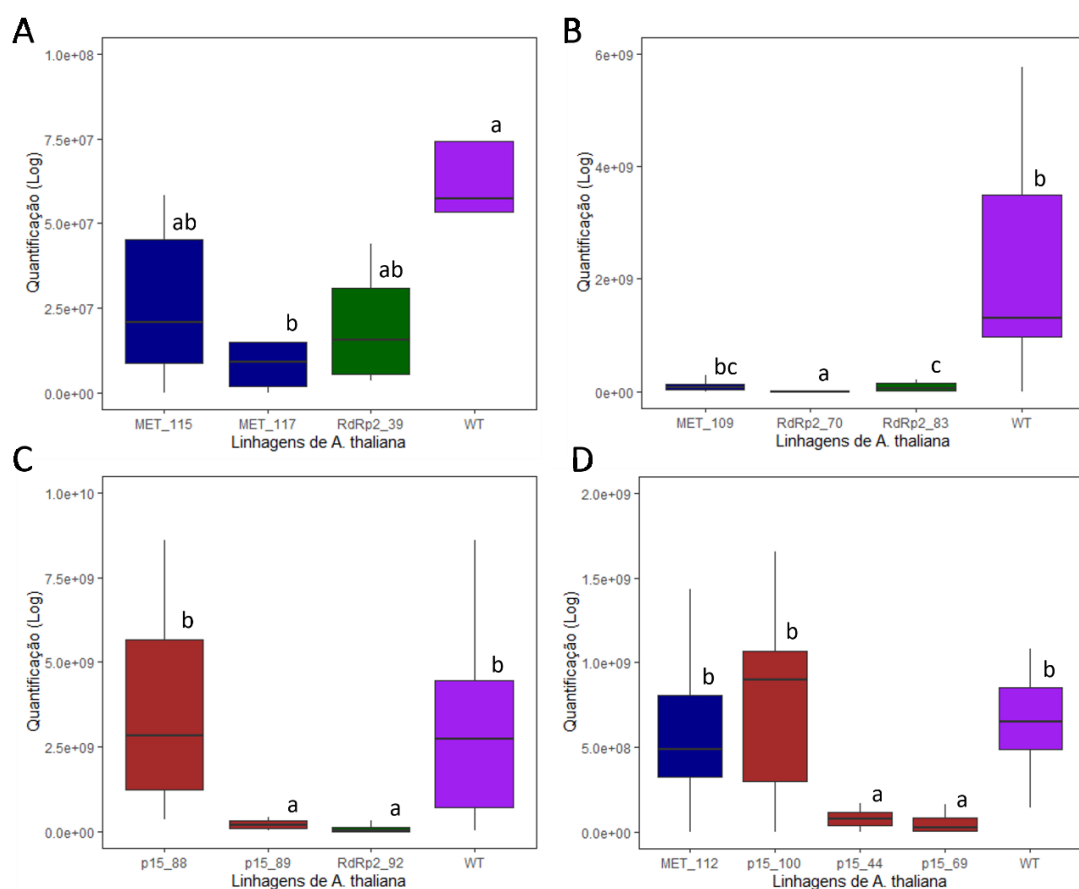


Figura 17: Carga viral de CiLV-C após o desafio das linhagens de plantas transgênicas e selvagens de *A. thaliana*. O genoma viral foi detectado mediante RT-qPCR. Outliers foram removidos dos gráficos para melhor visualização da distribuição dos dados, mas foram incluídos nas análises estatísticas. Diferenças estatísticas foram avaliadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis e Dunn, comparando os dados de cada grupo por experimento e são indicadas por diferentes letras ($p < 0.05$). **A.** Primeiro desafio. **B.** Segundo desafio. **C.** Terceiro desafio. **D.** Quarto desafio. As linhagens analisadas em cada desafio estão indicadas no eixo x dos gráficos.

6 DISCUSSÃO

As estatísticas apontam que na safra 2021-22 a taxa de queda de frutos de laranjas doces exclusivamente causada pela leprose dos citros alcançou um recorde histórico, atingindo 2,83% do total das quedas observadas (Fundecitrus, 2023). Considerando que o preço da caixa 40,8 kg de laranja doce no período foi a R\$46,3 (Cepea/Esalq, 2023, acesso 08/11/2023), as perdas resultaram na ordem dos R\$ 340 milhões (Fundecitrus, 2022). A magnitude das perdas, apesar da implementação de métodos estabelecidos de manejo da LC (Bassanezi, 2017), indicam a necessidade de avaliar alternativas mais

eficazes para o controle da doença. Nesse trabalho estabelecemos a premissa da abordagem de silenciamento gênico pós-transcricional (SGpT) como uma alternativa biotecnológica promissora para atenuar os efeitos de doenças virais em plantas. O SGpT é uma estratégia eficiente de controle específico contra pragas e patógenos (Collinge & Sarrocco, 2022; Koch & Wassenegger, 2021). Visando resistência a vírus, a abordagem pode ser implementada por meio da engenharia genética, produzindo modificações genômicas na planta que levam à expressão de um *hairpin*RNA (hpRNA) com sequências virais, que atuarão como agentes indutores do mecanismos de silenciamento gênico (Smith et al., 2000).

A indução do silenciamento gênico para resistência a vírus em *Arabidopsis thaliana* transgênicas que expressam microRNA artificial (amiRNA) ou siRNAs e desenvolvidas pela transformação por *floral dip* tem sido descrita (Niu et al., 2006; Nomura et al., 2004). Neste trabalho, *arabidopsis* foi escolhida para ser submetida às transformações genéticas e teste da eficácia do SGpT, em parte devido aos numerosos e extensos conhecimentos disponíveis sobre a sua interação com cilevírus (Arena et al., 2017, 2018, 2020, 2022). Este trabalho representa a primeira prova de conceito para validar a capacidade do SGpT como estratégia de resistência frente a infecção por um kitavírus, em particular o CiLV-C. Para tanto, foram geradas plantas transgênicas de *arabidopsis* que expressam três tipos de moléculas dsRNAs, numa estrutura de hpRNA, sendo que cada construção contém uma de duas regiões da ORF *RdRp* do RNA1 ou uma região da ORF *p15* do RNA2 de CiLV-C estirpe SJP.

A seleção das sequências alvos tem uma influência relevante na eficácia da construção genética para a indução do silenciamento, podendo levar a variações na eficiência do mecanismo (Chen et al., 2010; Tan et al., 2012). Por esse motivo, a escolha das regiões alvos neste trabalho tomou em conta a estratégia de expressão gênica do vírus alvo, a diversidade genética das estirpes conhecidas de CiLV-C e aspectos epidemiológicos da doença. Em CiLV-C várias proteínas tardias se expressam por meio da síntese de RNA subgenômico (sgRNA). Apenas os genes *RdRp* e *p15*, alvos selecionados nesse trabalho, estão posicionados no extremo 5' dos RNA1 e RNA2, respectivamente, e sua expressão acontece diretamente a partir do RNA genômico (Pascon et al., 2006). O gene *p29* do RNA1, e os genes *p61*, *mp* e *p24* do RNA2 de CiLV-C e alguns outros cilevírus, são expressos mediante sgRNAs (Pascon et al., 2006; Ramos-González et al., 2020). A acumulação significativamente maior de moléculas de sgRNA

durante a replicação viral do que o RNA genômico (Arena et al., 2020, 2022) pode resultar em um efeito de diluição na ação do siRNAs, reduzindo a eficácia do SGpT (Arvey et al., 2010) e intensificando o risco de evolução de mutantes com resistência parcial, capazes de evadir o silenciamento gênico (Martínez et al., 2012).

A ativação do mecanismo de silenciamento gênico contra diferentes vírus pode ser obtida através de construções de um único hairpinRNA contendo múltiplas regiões genômicas virais. A estratégia possibilita a indução de resistência até para vírus pertencentes a diferentes espécies (Akbarimotlagh et al., 2023). Plantas de soja transgênicas que produzem um único hpRNA com regiões extremamente conservadas dos genes *replicase* dos vírus do mosaico da alfafa (AMV, gênero *Alfavirus*), do mosaico do feijoeiro (BPMV, gênero *Comovirus*) e do mosaico da soja (SMV, gênero *Potyvirus*) apresentaram resistência à infecção simultânea aos três vírus alvos (Zhang et al., 2011). Embora não tenham sido desafiadas com diferentes estirpes dos três vírus, as regiões alvos apresentavam de 93-97% de similaridade entre as estirpes de cada vírus (Zhang et al., 2011). Outra abordagem para gerar maior abrangência mediante o SGpT foi empregada com a produção de um hpRNA contendo uma região altamente conservada do gene *Nlb* de SMV em plantas de soja transgênica. Nesse caso, a resistência foi efetiva contra o SMV e também contra os potyvírus do mosaico comum do feijoeiro (BCMV) e do mosaico da melancia (WMV) (Yang et al., 2017). Devido à identidade nucleotídica de pelo menos 90%, as plantas obtidas mostraram-se resistentes a cinco estirpes diferentes de SMV (SC3, SC7, SC15, SC18 e SC-R). Quando desafiados com BPMV, que apresenta entre 68-83% de identidade com a região alvo presente no hpRNA, os eventos transgênicos de soja apresentaram menor nível de resistência contra a infecção viral em comparação com a resistência ao SMV (Yang et al., 2017). Esses trabalhos demonstram a eficácia da escolha de regiões extremamente conservadas como alvos para o silenciamento de diferentes estirpes virais.

Levando em consideração que é possível induzir resistência a diferentes estirpes virais utilizando uma sequência do genoma viral conservada entre vírus de uma mesma espécie, neste trabalho identificamos regiões altamente conservadas entre os genomas de vírus representantes das três linhagens conhecidas de CiLV-C. As regiões estudadas, dentro das sequências das ORFs *RdRp* e *p15*, incluíram fragmentos de sequências do motivo MET (metiltransferase) do gene *RdRp* e do gene *p15*, que exibem 90% e 98% de identidade nucleotídica (i.n.) entre as diferentes linhagens, respectivamente.

Adicionalmente, com o intuito de realizar uma comparação com o uso de uma sequência menos conservada, uma região do motivo RdRp2 do gene *RdRp*, que apresenta 86% de i.n., também foi utilizada. As construções foram montadas baseadas no genoma de CiLV-C SJP, considerando que os vírus dessa estirpe são prevalentes na principal região produtora de laranjeiras do Brasil (Chabi-Jesus et al., 2021).

Devido à sua eficácia bem documentada (Zhang et al., 2006), o método de transformação genética *floral dip* foi escolhido para desenvolver as plantas transgênicas de arábidoide deste trabalho. A eficiência de transformação obtida nas nossas condições foi de 0,07% a 0,49% do total de sementes geradas, um valor dentro dos padrões relatados mediante a utilização de Silwet L-77 e sacarose, que é de 0,08% a 1% (Clough & Bent, 1998; Zhang et al., 2006). Apesar do sucesso com a implementação do protocolo *floral dip*, algumas considerações práticas sobre o procedimento podem ser relevantes: (i) a utilização do surfactante Silwet L-77 demonstrou ser um ponto crucial para o sucesso da transformação genética das plantas. Apesar do relato favorável sobre a adição de Tween-20 na solução de infiltração (Das & Joshi, 2011), nas nossas condições experimentais não foi possível recuperar plantas transgênicas utilizando esse detergente. (ii) A eficiência de transformação obtida neste trabalho foi mantida dentro dos padrões para o protocolo *floral dip*; no entanto, outros parâmetros podem ser suscetíveis de aperfeiçoamento, por exemplo: (a) aprimoramento do estágio da inflorescência durante a infecção com a bactéria na submersão. O grau de desenvolvimento da inflorescência é o ponto essencial para o sucesso da transformação uma vez que *A. tumefaciens* adentra os ovários apenas de flores ainda não abertas (botões florais) (Desfeux et al., 2000). Para tanto, a remoção de flores abertas na hora de submersão (Zhang et al., 2006) foi um passo extra realizado apenas durante as submersões com a construção MET-hp. Com a retirada das flores fecundadas na hora da submersão foi possível melhorar a eficiência de transformação (0,49%) em comparação com as construções RdRp2-hp e p15-hp (0,21% e 0,07%, respectivamente); (b) a indução de estresse hídrico às plantas após a submersão para aumentar a eficiência de transformação por *floral dip* em até 10% (Ali et al., 2022). Contudo, essa alternativa não foi explorada neste trabalho. A exploração dessas variáveis poderá ser útil para maximizar a eficiência da transformação do processo de transformação pelo método *floral dip*.

A presença do T-DNA e o número de cópias dos genes de interesse nas plantas transgênicas foi confirmada por métodos biológicos e moleculares: (i) desenvolvimento

de plântulas com folhas verdadeiras verdes no meio de seleção com antibiótico; (ii) detecção por PCR da presença dos genes *nptII*, que garante resistência à canamicina, e daqueles de origem viral presentes nas construções do *hairpin*; (iii) crescimento e desenvolvimento de plântulas da geração T₁ em meio contendo canamicina e determinação da proporção fenotípica regida pela segregação mendeliana do caráter resistência ao antibiótico, e (iv) determinação do número de cópias do transgene por qPCR no genoma da planta.

Através da observação da segregação mendeliana do fenótipo de resistência à canamicina nas plantas da geração T₁ foi estimado que a maioria das plantas transgênicas possuíam uma única cópia do T-DNA no seu genoma, com exceção de apenas uma linhagem transgênica que demonstrou ter duas cópias (RdRp2-hp_92). De fato, a integração de uma única cópia do T-DNA parece ser o padrão quando o método de transformação envolve a técnica de *floral dip* (Das & Joshi, 2011).

Em paralelo, as análises moleculares de caracterização das plantas transgênicas mediante qPCR confirmaram os resultados das análises de segregação, com a exceção da linha RdRp2-hp_92, na qual o qPCR indicou uma única cópia do transgene, contradizendo a observação biológica, possivelmente devido à baixa eficiência dos iniciadores utilizados. As análises do número de cópias de transgenes por qPCR são uma alternativa frequentemente utilizada (Głowacka et al., 2016; Kanwar et al., 2022), mas a utilização de fluoróforos intercalantes pode requerer uma otimização experimental intensiva e múltiplas reações por amostras para distinguir com precisão entre uma e duas cópias do transgene (Bubner et al., 2004). Uma alternativa mais precisa envolve o uso de sondas de hidrólise, o que também representa maior custo operacional (Bubner & Baldwin, 2004). Alternativamente, o número de cópias de transgenes também pode ser estimado mediante a técnica de PCR digital (dPCR) (Hindson et al., 2011), comparando a quantificação do transgene com a quantificação de um gene de referência com número de cópias sabido (Collier et al., 2017). Em comparação com o qPCR, o dPCR pode ser mais preciso, não depende de curvas padrões e tem sido demonstrado ser tão confiável quanto o Southern blot (Cai et al., 2021; Collier et al., 2017; Hindson et al., 2011). A técnica do PCR invertido (iPCR) (Does et al., 1991) também permite a identificação do número de cópias dos transgenes e, adicionalmente, permite reconhecer o sítio de inserção do T-DNA no genoma da planta transgênica. O uso do iPCR e dPCR poderão ser

avaliadas para aprofundar na caracterização molecular das plantas transgênicas obtidas no presente trabalho.

O grau de resistência garantida pela indução do silenciamento gênico pode depender do siRNAs produzido nas plantas transgênicas (Gaba et al., 2010). Através do si-Fi foi possível estimar a diversidade quantificada através do número de possíveis fragmentos de siRNAs produzidos a partir das construções desenvolvidas e a sua possível eficiência contra os genomas das três estirpes de CiLV-C (SJP, CRD e ASU) assim como de outros membros do gênero *Cilevirus* (PfGSV e CiLV-C2). Como era de se esperar uma vez que as construções foram desenhadas sobre o genoma da estirpe SJP, a maior quantidade de siRNAs eficientes foram identificados contra essa estirpe. Contra os genomas das estirpes CRD e ASU, uma quantidade menor de siRNAs totais e eficientes derivada dos fragmentos MET-hp e RdRp2-hp foi observada, provavelmente devido à menor identidade nucleotídica entre as estirpes nessas regiões. Possivelmente por conta do alto nível de identidade do gene *p15* entre as estirpes, uma quantidade similar de siRNAs foi identificado contra este fragmento nos genomas das três estirpes. Estes resultados indicam que todas as construções devem ser eficazes em induzir o silenciamento contra a infecção pela estirpe SJP, mas é possível que a construção RdRp2-hp seja menos eficiente contra CRD, seguido de MET-hp. Essa hipótese deverá ser avaliada biologicamente através da inoculação de vírus da estirpe CRD nas plantas transgênicas. Como esperado, e de acordo com a alta divergência nucleotídica entre os genomas de CiLV-C e os genomas de PfGSV e CiLV-C2, não foram identificados siRNAs capazes de atingir esses vírus. Embora a resistência viral possa estar relacionada com a maior quantidade de siRNAs produzidos, no caso de limas ácidas (*C. aurantiifolia*) transgênicas resistentes ao vírus da tristeza do vírus (CTV), a resistência induzida por SGpT foi melhor correlacionada com um menor número de transcritos do transgene e não à maior acumulação de siRNAs (Fagoaga et al., 2006; López et al., 2010), provavelmente devido ao possível silenciamento transcricional de transgenes com alto acúmulo de transcritos.

A especificidade do silenciamento gênico é garantida pela complementariedade da sequência do siRNA ao seu alvo. No entanto, existe a possibilidade de que o silenciamento possa afetar a expressão de genes não específicos levando ao efeito de silenciamento fora de alvo (não intencional ou *off-target*) (Senthil-Kumar & Mysore, 2011). O efeito fora de alvo está principalmente relacionado com a identidade entre o siRNA derivado do dsRNA e o mRNA não alvo, permitindo a degradação de genes não

desejada (Jackson et al., 2003; Xu et al., 2006). A probabilidade do efeito fora de alvo pode ser avaliada através de ferramentas bioinformáticas, como dsCheck (Naito et al., 2005) e si-Fi (Lück et al., 2019). Neste trabalho, as análises com o software dsCheck revelaram uma quantidade não significativa de *loci* com possíveis alvos não específicos no genoma de *A. thaliana* com os fragmentos MET, RdRp2 e p15 de CiLV-C. No entanto, é preciso levar em conta que essa ferramenta foi inicialmente desenvolvida para análise em *Drosophila* sp., onde uma sequência de fita dupla de 19 nts com 100% de identidade é o suficiente para a degradação do mRNA (Naito et al., 2005). Para uma análise mais robusta foi utilizada a ferramenta si-Fi, que prevê a eficiência dos siRNAs de 21 nts. Nesse caso, não foram identificados alvos não específicos no genoma de arábida e de laranja doce com as três sequências virais empregadas. As análises computacionais têm demonstrado que uma sequência com 21-22 nts e 100% de identidade com o alvo é necessário para guiar o silenciamento contra genes não específicos em plantas (Xu et al., 2006). No entanto, a existência de *mismatches* na região de reconhecimento do siRNA também pode levar ao silenciamento gênico e inibição de transcrição de genes não alvos (Senthil-Kumar et al., 2007). Diversos fatores da interação siRNA-RISC-mRNA podem estar relacionados com o efeito fora de alvo (Jackson et al., 2006; Kamola et al., 2015; Neumeier & Meister, 2021; Senthil-Kumar & Mysore, 2011).

Enquanto as análises realizadas com o si-Fi não revelaram possíveis *off-target* no genoma de laranja doce, um possível *off-target* foi identificado no genoma de *B. yothersi*, o ácaro vetor do vírus. Um siRNA eficiente gerado a partir do fragmento RdRP2 apresentou 100% de identidade com uma região genômica, de função desconhecida, no ácaro. Esse resultado pode ser relevante no contexto de outros trabalhos em andamento do nosso grupo de pesquisa. Em um experimento realizado para identificar o perfil de RNAs de pequeno tamanho (siRNA e miRNA) de *Brevipalpus* virulíferos foi identificado um fragmento de 22 nts, provavelmente um siRNA, que é 100% conservado na região intergênica do RNA2 de CiLV-C e em um gene do ácaro para uma possível RdRp. A descoberta por meios teóricos da possível existência de um siRNA que é derivado do fragmento de CiLV-C incluído na formação do *hairpin* RdRp2, junto à identificação de outro siRNA no estudo do perfil de RNAs de pequeno tamanho, poderiam indicar a existência de um intenso intercâmbio regulatório entre o vírus e o seu vetor. A presença desses RNA de pequeno tamanho, por sua vez, sugere a participação do mecanismo de silenciamento gênico cuja funcionalidade nos ácaros *Brevipalpus* é

totalmente desconhecida. O estudo, embora parcial, do genoma de *B. yothersi* (Navia et al., 2019) tem revelado a presença de possíveis genes homólogos daqueles que participam da via de miRNA de insetos. Os genes detectados são dois homólogos de RdRp e dois homólogos de AGO2, além de outros homólogos de Dicer (Nunes & Novelli, dados não publicados).

Embora especulativo até o momento, aprofundar no conhecimento sobre a participação dos siRNAs na modulação da interação entre CiLV-C e *B. yothersi* se converte numa janela de estudos necessária, pois é altamente desejável avaliar a possibilidade de utilizar a produção de *hairpin* contra genes alvos do ácaro, e se uma mesma sequência, por exemplo, derivada do motivo RdRp2 do vírus, pode ter como alvo o vírus e o ácaro, simultaneamente. A utilização do RNAi contra insetos, ácaros e outros artrópodes com dsRNA pode ser aplicado de diversas maneiras (Suzuki et al., 2017) e regularmente são utilizados como genes alvos aqueles envolvidos na reprodução e fisiologia do organismo, i.e. genes envolvidos no catabolismo de xenobióticos e na ecdise (Niu et al., 2018; Pomerantz & Hoy, 2015; Wei et al., 2021; Wu & Hoy, 2014).

Os experimentos de desafio das plantas transgênicas demonstraram que a produção de uma molécula de RNA do tipo *hairpin* é efetiva contra o CiLV-C. Embora novas análises com um número maior de linhagens devam ser ainda conduzidas, os resultados obtidos revelam que alvos nas diferentes regiões genômicas do CiLV-C podem gerar linhas com diferentes graus de resistência mediante o SGpT. Os desafios conduzidos com as plantas das linhagens RdRp2-hp apresentaram um nível de resistência geralmente superior, com uma redução na acumulação viral de 70-100% em comparação com as plantas selvagens. Essa observação está de acordo com as análises *in silico*, que demonstraram a possibilidade de uma maior produção de siRNAs a partir do fragmento RdRp2, possivelmente devido ao seu maior tamanho em comparação com os fragmentos MET e p15. No futuro, a acumulação de siRNAs poderá ser avaliada por *Northern blot* nas linhas RdRp, MET e p15, a fim de confirmar as análises *in silico*. Em contraposição, duas linhas com a construção p15-hp apresentaram uma carga viral semelhante à da planta selvagem. Entre as linhas MET-hp, as plantas demonstraram uma maior variação de resistência, com uma redução na carga viral de 61-96,6%. Uma das linhas com a construção RdRp2-hp é de particular interesse uma vez que nela os níveis de carga viral foram na ordem de $4,01E+04$ aos 10 dias após infestação. Esse valor de carga viral na linha RdRp2-hp_70 é equivalente ao descrito em plantas de *Arabidopsis* selvagens

infectadas com CiLV-C, mas às 48h após infestação ($1E+04$ partículas) (Arena et al., 2022), o que sugere que essa linha pode ser imune, uma vez que, possivelmente, a carga viral detectada era a presente nos ácaros virulíferos e não da replicação do vírus na planta. Novos experimentos de desafios serão realizados com gerações T₂ e T₃ dessa linha para, além de conferir a estabilidade do caráter de resistência, conferir a expressão do gene *p29* e estabelecer a relação entre a acumulação dos transcritos do sgRNA *p29* e do genoma RNA1 de CiLV-C.

O acompanhamento diário do desenvolvimento dos sintomas durante o desafio das plantas selvagens e transgênicas possibilitou estudar a correlação entre a severidade dos sintomas e a carga viral determinada no final do desafio das linhas transgênicas. Uma relação diretamente proporcional foi observada no primeiro desafio realizado. No entanto essa correlação não foi tão clara nos outros desafios conduzidos em algumas linhas transgênicas. Vários fatores poderiam estar influenciando a relação entre a evolução dos sintomas e carga viral, entre eles, o fato de que os experimentos de desafios terem sido realizados com plantas da geração T₁. Espera-se que as plantas das gerações T₂ e T₃ apresentem maior homogeneidade na resposta considerando que deverão ser homocigotas.

Em próximas etapas, as linhas transgênicas mais promissoras e das gerações T₂ e T₃ serão desafiadas com a estirpe CRD de CiLV-C para avaliar se a resistência observada contra SJP também pode garantir resistência contra outra estirpe de CiLV-C. Ademais, diversas abordagens poderão ser exploradas com o intuito de aperfeiçoar o sistema de indução do SGpT desenvolvido neste trabalho. Nas construções genéticas atuais, a expressão do *hairpinRNA* é conduzida pelo promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor, amplamente utilizado em diversas espécies vegetais (Amack & Antunes, 2020). Para contornar a expressão constitutiva, que seria ineficiente no caso da LC na ausência de uma infecção viral, um objetivo pertinente será avaliar o uso de promotores transcricionais dos genes induzíveis, por exemplo, em resposta ao ácaro em laranja doce (Arena et al., 2018). Construções com tais características tem sido utilizadas contra o nematoide *Meloidogyne incógnita* em plantas de tomate transgênica, o que garantiu a ativação da resistência contra o nematoide de maneira específica durante a infecção (Thorat et al., 2024). Outra alternativa seria utilizar promotores transcricionais de genes expressos especificamente no tecido do epicarpo da laranja doce, uma vez que os ácaros são encontrados com maior frequência nos frutos do que nas folhas em campo

(Chiavegato, 1986) e CiLV-C apresenta maior carga viral neste tecido do que em limbo foliar (Barro, 2022).

A indução do SGpT contra infecções virais em plantas transgênicas de citros é uma estratégia viável (Goulin et al., 2019). Diversos estudos têm investigado o uso de plantas transgênicas de *Citrus* para resistência a patógenos como fungos, vírus, bactérias e oomicetos, incluindo em experimentos de campo (Anderson et al., 2015; Caserta et al., 2019; Sun et al., 2019). Ainda assim, existem outras abordagens para estimular o SGpT que podem contornar a utilização de plantas transgênicas. Por exemplo, a aplicação tópica de um dsRNA com sequências específicas do CTV proporcionou a recuperação de plantas não transgênicas (Borah et al., 2023). Outra estratégia que merece atenção é a utilização de um enxerto de tecido transgênico intermediário entre o porta-enxerto e a copa não transgênicos, o qual garantiu a recuperação à infecção por CPsV (De Francesco et al., 2020).

Independentemente da estratégia empregada para estimular o SGpT em futuras intervenções em plantas de laranjeiras, os resultados apresentados no presente estudo são a prova de conceito da eficácia do mecanismo de SGpT para estimular resistência à LC. Ao mesmo tempo, tanto as plantas transgênicas geradas como as metodologias utilizadas neste trabalho constituem ferramentas úteis para a concepção e o desenvolvimento de novos protocolos e estratégias que visem implementar o SGpT no controle da LC em campo.

7 CONCLUSÕES

1. Trinta e oito plantas de *arabidopsis* transgênicas foram obtidas mediante a transformação por *floral dip* utilizando-se o surfactante Silwet L-77;
2. Linhagens transgênicas contendo as três construções testadas induziram o silenciamento gênico pós transcricional, sendo que o domínio RdRp2 do gene *RdRp* (RNA1) de CiLV-C garantiu os níveis mais elevados de resistência à infecção viral;
3. Demonstrou-se, pela primeira vez, a viabilidade da indução do SGpT para o controle da leprose dos citros.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akbarimotlagh, M., Azizi, A., Shams-bakhsh, M., Jafari, M., Ghasemzadeh, A., & Palukaitis, P. (2023). Critical points for the design and application of RNA silencing constructs for plant virus resistance. *Advances in Virus Research*, *115*, 159–203. <https://doi.org/10.1016/BS.AIVIR.2023.02.001>
- Alberti, G., Andrade, D. J., Garita, L. C., & Kitajima, E. W. (2014). Anatomy and Fine Structure of Brevipalpus Mites (Tenuipalpidae) - Economically Important Plant-Virus Vectors - Part 3 : Digestive System. *Zoologica*, *160*, 67–94.
- Ali, I., Sher, H., Ali, A., Hussain, S., & Ullah, Z. (2022). Simplified floral dip transformation method of Arabidopsis thaliana. *Journal of Microbiological Methods*, *197*(October). <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106492>
- Alquezar, B., Carmona, L., Bennici, S., Miranda, M. P., Bassanezi, R. B., & Peña, L. (2022). Cultural Management of Huanglongbing: Current Status and Ongoing Research. *Phytopathology*, *112*(1), 11–25. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-21-0358-IA>
- Amack, S. C., & Antunes, M. S. (2020). CaMV35S promoter – A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. *Current Plant Biology*, *24*, 100179. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100179>
- Anderson, C. M., Plata, M. I., Garavello, M., Costa, N., & Peña, L. (2015). Results from a three years field trial planted at concordia, argentina using transgenic rootstocks potentially resistant to tristeza. *Acta Horticulturae*, *1065*, 345–350. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.41>
- Aragão, F. J. L., Nogueira, E. O. P. L., Tinoco, M. L. P., & Faria, J. C. (2013). Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. *Journal of Biotechnology*, *166*(1–2), 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.04.009>
- Arena, G. D., Ramos-González, P. L., Falk, B. W., Casteel, C. L., Freitas-Astúa, J., & Machado, M. A. (2020). Plant Immune System Activation Upon Citrus Leprosis Virus C Infection Is Mimicked by the Ectopic Expression of the P61 Viral Protein. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.01188/FULL>
- Arena, G. D., Ramos-González, P. L., Nunes, M. A., Jesus, C. C., Calegario, R. F., Kitajima, E. W., Novelli, V. M., Freitas-Astúa, J., Arena, G. D., Ramos-González, P. L., Nunes, M. A., Jesus, C. C., Calegario, R. F., Kitajima, E. W., Novelli, V. M., & Freitas-Astúa, J. (2017). Arabidopsis thaliana as a model host for Brevipalpus mite-transmitted viruses. *Scientia Agricola*, *74*(1), 85–89. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2015-0380>
- Arena, G. D., Ramos-González, P. L., Nunes, M. A., Ribeiro-Alves, M., Camargo, L. E. A., Kitajima, E. W., Machado, M. A., & Freitas-Astúa, J. (2016). Citrus leprosis virus C infection results in hypersensitive-like response, suppression of the JA/ET plant defense pathway and promotion of the colonization of its mite vector. *Frontiers in Plant Science*, *7*(NOVEMBER2016), 1757. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.01757/BIBTEX>
- Arena, G. D., Ramos-González, P. L., Rogerio, L. A., Ribeiro-Alves, M., Casteel, C. L., Freitas-Astúa, J., & Machado, M. A. (2018). Making a better home: modulation of plant defensive response by brevipalpus mites. *Frontiers in Plant Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01147>
- Arena, G. D., Ramos-González, P. L., Tassi, A. D., Machado, M. A., & Freitas-Astúa, J. (2022). A TaqMan RT-qPCR assay for absolute quantification of citrus leprosis virus C lineage SJP: disclosing the subgenomic/genomic ratio in plant and mite vector, plant organ-specific viral loads, and the kinetics of viral accumulation in

- plants. *Tropical Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s40858-022-00539-4>
- Argolo, P. S., Revynthi, A. M., Canon, M. A., M. Berto, M., Andrade, D. J., Döker, İ., Roda, A., & Carrillo, D. (2020). Potential of predatory mites for biological control of *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae). *Biological Control*, 149.
- Arvey, A., Larsson, E., Sander, C., Leslie, C. S., & Marks, D. S. (2010). Target mRNA abundance dilutes microRNA and siRNA activity. *Molecular Systems Biology*, 6(363). <https://doi.org/10.1038/msb.2010.24>
- Barro, M. P. (2022). *Carga viral das estirpes de CiLV-C e seu potencial impacto na epidemiologia da leprose dos citros*. Instituto Biológico, São Paulo, Brazil.
- Bassanezi, R. B. (2004). *Leprose dos citros: foco no controle do ácaro vetor*. 24–39.
- Bassanezi, R. B. (2017). *Leprose dos citros: Medidas essenciais de controle*. Fundecitrus, 2nd Edn. http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manual_detalhes/leprose-dos-citros/60
- Bassanezi, R. B. (2018). *Fatores que dificultam o controle do ácaro da leprose*. Fundecitrus.
- Bassanezi, R. B., Czermainski, A. B. C., Laranjeira, F. F., Moreira, A. S., Ribeiro, P. J., Krainski, E. T., & Amorim, L. (2019). Spatial patterns of the Citrus leprosis virus and its associated mite vector in systems without intervention. *Plant Pathology*, 68(1), 85–93. <https://doi.org/10.1111/ppa.12930>
- Bastianel, M., De Oliveira, A. C., Cristofani, M., Guerreiro Filho, O., Freitas-Astúa, J., Rodrigues, V., Astúa-Monge, G., & Machado, M. A. (2006). Inheritance and heritability of resistance to citrus leprosis. *Phytopathology*, 96(10), 1092–1096. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1092>
- Bastianel, M., Freitas-Astúa, J., Nicolini, F., Segatti, N., Novelli, V. M., Rodrigues, V., Medina, C. L., & Machado, M. A. (2008). RESPONSE OF MANDARIN CULTIVARS AND HYBRIDS TO CITRUS LEPROSIS VIRUS. *Journal of Plant Pathology*, 90(2), 307–312. <https://doi.org/10.4454/JPP.V90I2.666>
- Bastianel, M., Novelli, V. M., Kitajima, E. W., Kubo, K. S., Bassanezi, R. B., Machado, M. A., & Freitas-Astúa, J. (2010). Citrus leprosis: Centennial of an unusual mite-virus pathosystem. *Plant Disease*, 94(3), 284–292. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0284>
- Bastianel, M., Pereira-Martin, J. A., Novelli, V. M., Freitas-Astúa, J., & Nunes, M. A. (2018). Citrus leprosis resistance within the citrus group. *VirusDisease*, 29(4), 491–498. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0489-6>
- Beatrice, P., Chiatante, D., Scippa, G. S., & Montagnoli, A. (2022). Photoreceptors' gene expression of *Arabidopsis thaliana* grown with biophilic LED-sourced lighting systems. *PLoS ONE*, 17(6 June), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269868>
- Bicar, E. H. (2009). Characterizing Transgene Inheritance. *Methods in Molecular Biology*, 526, 147–159. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0_13
- Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/NAR/7.6.1513>
- Bitancourt, A. (1934). Relação das doenças e fungos parasitas observados na secção de fitopatologia durante os anos de 1931 e 1932. *Arquivos Do Inst. Biológico*, 5, 185–196.
- Bonfim, K., Faria, J. C., Nogueira, E. O. P. L., Mendes, É. A., & Aragão, F. J. L. (2007). RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(6), 717–726. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0717>

- Borah, M., Nath, P. D., Chaudhury, S. P., Biswas, K. K., Patil, B. L., & Voloudakis, A. (2023). Topical application of dsRNAs targeting Citrus tristeza virus (CTV) reduces its titer in the CTV infected sweet orange (*Citrus sinensis*). *European Journal of Plant Pathology*, 0123456789, 6–11. <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02752-6>
- Bouché, N., Laressergues, D., Gascioli, V., & Vaucheret, H. (2006). An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *EMBO Journal*, 25(14), 3347–3356. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601217>
- Bubner, B., & Baldwin, I. T. (2004). Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 23(5), 263–271. <https://doi.org/10.1007/S00299-004-0859-Y/METRICS>
- Bubner, B., Gase, K., & Baldwin, I. T. (2004). Two-fold differences are the detection limit for determining transgene copy numbers in plants by real-time PCR. *BMC Biotechnology*, 4, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-14>
- Cai, Y. M., Dudley, Q. M., & Patron, N. J. (2021). Measurement of Transgene Copy Number in Plants Using Droplet Digital PCR. *Bio-Protocol*, 11(13). <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOCOL.4075>
- Campos, F. J., & Omoto, C. (2002). Resistance to hexythiazox in *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) from Brazilian citrus. *Experimental & Applied Acarology*, 26(3–4), 243–251. <https://doi.org/10.1023/A:1021103209193>
- Cangelosi, G. A., Ankenbauer, R. G., & Nester, E. W. (1990). Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(17), 6708–6712. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.17.6708>
- Cao, Y., Zhou, H., Zhou, X., & Li, F. (2020). Control of Plant Viruses by CRISPR/Cas System-Mediated Adaptive Immunity. *Frontiers in Microbiology*, 11(October), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.593700>
- Carbonell, A., & Carrington, J. C. (2015). Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Current Opinion in Plant Biology*, 27(Dcl), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.06.013>
- Caserta, R., Teixeira-Silva, N. S., Granato, L. M., Dorta, S. O., Rodrigues, C. M., Mitre, L. K., Yochikawa, J. T. H., Fischer, E. R., Nascimento, C. A., Souza-Neto, R. R., Takita, M. A., Boscariol-Camargo, R. L., Machado, M. A., & De Souza, A. A. (2019). Citrus biotechnology: What has been done to improve disease resistance in such an important crop? *Biotechnology Research and Innovation*, 3, 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.12.004>
- Castro, E. B., Mesa, N. C., Feres, R. J. F., de Moraes, G. J., Ochoa, R., Beard, J. J., & Demite, P. R. (2020). A newly available database of an important family of phytophagous mites: Tenuipalpidae Database. *Zootaxa*, 4868(4), 577–583. <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.4868.4.7>
- Cepea/ Esalq. (2023). *Preços agropecuárias | Citros*. <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/citros.aspx>
- Chabi-Jesus, C., Ramos-González, P. L., Postclam-Barro, M., Fontenele, R. S., Harakava, R., Bassanezi, R. B., Moreira, A. S., Kitajima, E. W., Varsani, A., & Freitas-Astúa, J. (2021). Molecular Epidemiology of Citrus Leprosis Virus C: A New Viral Lineage and Phylodynamic of the Main Viral Subpopulations in the Americas. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.641252>
- Chabi-Jesus, C., Ramos-González, P. L., Tassi, A. D., Guerra-Peraza, O., Kitajima, E. W., Harakava, R., Beserra, J. E. A., Salaroli, R. B., & Freitas-Astúa, J. (2018).

- Identification and characterization of citrus chlorotic spot virus, a new dichorhavirus associated with citrus leprosis-like symptoms. *Plant Disease*, 102(8), 1588–1598. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1425-RE>
- Chabi-Jesus, C., Ramos-González, P. L., Tassi, A. D., Rossetto Pereira, L., Bastianel, M., Lau, D., Canale, M. C., Harakava, R., Novelli, V. M., Kitajima, E. W., & Freitas-Astúa, J. (2023). Citrus Bright Spot Virus: A New Dichorhavirus, Transmitted by *Brevipalpus azores*, Causing Citrus Leprosis Disease in Brazil. *Plants*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/plants12061371>
- Chen, X., Liu, J., Xu, L., Jiang, F., Xie, X., Zhu, C., & Wen, F. (2010). Inhibiting Virus Infection by RNA Interference of the Eight Functional Genes of the Potato Virus Y Genome. *Journal of Phytopathology*, 158(11–12), 776–784. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01701.x>
- Chiavegato, L. (1986). Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 21(8), 813–816.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 16(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.1998.00343.X>
- Collier, R., Dasgupta, K., Xing, Y. P., Hernandez, B. T., Shao, M., Rohozinski, D., Kovak, E., Lin, J., de Oliveira, M. L. P., Stover, E., McCue, K. F., Harmon, F. G., Blechl, A., Thomson, J. G., & Thilmony, R. (2017). Accurate measurement of transgene copy number in crop plants using droplet digital PCR. *Plant Journal*, 90(5), 1014–1025. <https://doi.org/10.1111/tpj.13517>
- Collinge, D. B., & Sarrocco, S. (2022). Transgenic approaches for plant disease control: Status and prospects 2021. *Plant Pathology*, 71(1), 207–225. <https://doi.org/10.1111/ppa.13443>
- Conceschi, M. R. (2013). *Potencialidade dos fungos entomopatogênicos Isaria fumosorosea e Beauveria bassiana para o controle de pragas dos citros*. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz.”
- Cook, G., Kirkman, W., Clase, R., Steyn, C., Basson, E., Fourie, P. H., Moore, S. D., Grout, T. G., Carstens, E., & Hattingh, V. (2019). Orchid fleck virus associated with the first case of citrus leprosis-N in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 155(4), 1373–1379. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01854-4>
- Cruz-Jaramillo, J. L., Ruiz-Medrano, R., Rojas-Morales, L., López-Buenfil, J. A., Morales-Galván, O., Chavarín-Palacio, C., Ramírez-Pool, J. A., & Xoconostle-Cázares, B. (2014). Characterization of a Proposed Dichorhavirus Associated with the Citrus Leprosis Disease and Analysis of the Host Response. *Viruses*, 6(7). <https://doi.org/10.3390/V6072602>
- da Silva, M. Z., de Oliveira, C. A. L., & Sato, M. E. (2009). Seletividade de produtos fitossanitários sobre o ácaro predador *Agistemus brasiliensis* Matioli, Ueckermann & Oliveira (Acari: Stigmaeidae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31(2), 388–396. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452009000200012>
- Da Silva, M. Z., Sato, M. E., De Oliveira, C. A. L., & Nicastro, R. L. (2015). Interspecific interactions involving *neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) and *agistemus brasiliensis* (Acari: Stigmaeidae) as predators of *brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). *Experimental and Applied Acarology*, 65(3), 319–329. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9874-z>
- Dalakouras, A., Wassenegger, M., Dadami, E., Ganopoulos, I., Pappas, M. L., & Papadopoulou, K. (2020). Genetically modified organism-free RNA interference: Exogenous application of RNA molecules in plants1[open]. *Plant Physiology*,

- 182(1), 38–50. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00570>
- Das, P., & Joshi, N. C. (2011). Minor modifications in obtainable Arabidopsis floral dip method enhances transformation efficiency and production of homozygous transgenic lines harboring a single copy of transgene. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 02(02), 59–67. <https://doi.org/10.4236/abb.2011.22010>
- de Andrade, D., de Leite Oliveira, C. A., Fernando, C. P., & Siqueira, D. S. (2010). Acaricidas utilizados na citricultura convencional e orgânica: manejo da leprose e populações de ácaros fitoseídeos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32(4), 1028–1037. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011005000013>
- De Francesco, A., Costa, N., & García, M. L. (2017). Citrus psorosis virus coat protein-derived hairpin construct confers stable transgenic resistance in citrus against psorosis A and B syndromes. *Transgenic Research*, 26(2), 225–235. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-0001-2>
- De Francesco, A., Simeone, M., Gómez, C., Costa, N., & García, M. L. (2020). Transgenic Sweet Orange expressing hairpin CP-mRNA in the interstock confers tolerance to citrus psorosis virus in the non-transgenic scion. *Transgenic Research*, 29(2), 215–228. <https://doi.org/10.1007/s11248-020-00191-1>
- de Lillo, E., Freitas-Astúa, J., Kitajima, E. W., Ramos-González, P. L., Simoni, S., Tassi, A. D., & Valenzano, D. (2021). Phytophagous mites transmitting plant viruses: Update and perspectives. *Entomologia Generalis*, 41(5), 439–462. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2021/1283>
- Della Vechia, J. F., Bassanezi, R. B., & Andrade, D. J. (2019). Physicochemical and biological compatibility of insecticide mixtures with acaricide in the management of *Brevipalpus yothersi*. *Systematic and Applied Acarology*, 24(8), 1455–1464. <https://doi.org/10.11158/saa.24.8.8>
- Della Vechia, J. F., Ferreira, M. C., & Andrade, D. J. (2018). Interaction of spiroadiclofen with insecticides for the control of *Brevipalpus yothersi* in citrus. *Pest Management Science*, 74(11), 2438–2443. <https://doi.org/10.1002/PS.4918>
- Della Vechia, J. F., Kapp, A. B. P., Rocha, C. M., & Andrade, D. J. (2023). Side effects of insecticides alone or in a mixture with acaricide on life history traits and demographic parameters of *Brevipalpus yothersi*. *Systematic and Applied Acarology*, 28(6), 1160–1178. <https://doi.org/10.11158/saa.28.6.11>
- Dellaporta, S., Wood, J., & Hicks, J. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19–21.
- Deng, Z., Ma, L., Zhang, P., & Zhu, H. (2022). Small RNAs Participate in Plant–Virus Interaction and Their Application in Plant Viral Defense. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23020696>
- Desfeux, C., Clough, S. J., & Bent, A. F. (2000). Female reproductive tissues are the primary target of Agrobacterium-mediated transformation by the Arabidopsis floral-dip method. *Plant Physiology*, 123(3), 895–904. <https://doi.org/10.1104/PP.123.3.895>
- Dietzgen, R. G., Freitas-Astúa, J., Chabi-Jesus, C., Ramos-González, P. L., Goodin, M. M., Kondo, H., Tassi, A. D., & Kitajima, E. W. (2018). Dichorhavirus in their Host Plants and Mite Vectors. *Advances in Virus Research*, 102, 119–148. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.06.001>
- Dzianott, A., Sztuba-Solińska, J., & Bujarski, J. J. (2012). Mutations in the antiviral RNAi defense pathway modify brome mosaic virus RNA recombinant profiles. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(1), 97–106. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-11-0137>

- EMBRAPA. (2015). *Um sistema e um feijão transgênico para enfrentar o mosaico-dourado*. Portal EMBRAPA. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8534579/um-sistema-e-um--feijao-transgenico-para-enfrentar-o-mosaico-dourado>
- Fagoaga, C., López, C., De Mendoza, A. H., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., & Peña, L. (2006). Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of Citrus tristeza virus confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant Molecular Biology*, 60(2), 153–165. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-3129-7>
- Fawcett, H. S. (1911). Scaly bark or nail-head rust of citrus. In *Bulletin. Florida Agricultural Experiment Station*.
- Feldmann, K. A., & David Marks, M. (1987). Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of Arabidopsis thaliana: A non-tissue culture approach. *MGG Molecular & General Genetics*, 208(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1007/BF00330414>
- Folimonova, S. Y. (2013). Developing an understanding of cross-protection by citrus tristeza virus. *Frontiers in Microbiology*, 4(APR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00076>
- Folimonova, S. Y., Achor, D., & Bar-Joseph, M. (2020). Walking together: Cross-protection, genome conservation, and the replication machinery of citrus tristeza virus. *Viruses*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/v12121353>
- Foreign Agriculture Service/EUA. (2024). *Citrus: World Markets and Trade*. <https://fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>
- Franco, C. R., Casarin, N. F. B., Domingues, F. A., & Omoto, C. (2007). [Resistance of Brevipalpus phoenicis (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) to acaricides that inhibit cellular respiration in citrus: cross-resistance and fitness cost]. *Neotropical Entomology*, 36(4), 565–576. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2007000400015>
- Freitas-Astúa, J., Fadel, A. L., Bastianel, M., Novelli, M., Antonioli-Luizon, R., & Machado, M. A. (2008). Resposta diferencial de espécies e de híbridos de citros à leprose. *Pesq. Agropec. Bras*, 7, 809–814.
- Freitas-Astúa, J., Ramos-González, P. L., Arena, G. D., Tassi, A. D., & Kitajima, E. W. (2018). Brevipalpus-transmitted viruses: parallelism beyond a common vector or convergent evolution of distantly related pathogens? *Current Opinion in Virology*, 33, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.07.010>
- Fundecitrus. (2022). *Reestimativa da safra de laranja 2021/22 do cinturão citrícola de São Paulo e triângulo/suldoeste mineiro - Fechamento em Abril/2021*. <https://www.fundecitrus.com.br/pes/estimativa>
- Fundecitrus. (2023). Inventário de árvores e estimativa da safra de laranja do cinturão citrícola de São Paulo e triângulo/sudeste mineiro: retrato dos pomares em março de 2023. *Fundecitrus*, 114.
- FUNDECITRUS. (2024). Safra de laranja 2023/24 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro. *Pesquisa de Estimativa de Safra*.
- Fusaro, A. F., Matthew, L., Smith, N. A., Curtin, S. J., Dedic-Hagan, J., Ellacott, G. A., Watson, J. M., Wang, M. B., Brosnan, C., Carroll, B. J., & Waterhouse, P. M. (2006). RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO Reports*, 7(11), 1168–1175. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOR.7400837>
- Fuzita, A. T., Sato, M. E., Zatti Da Silva, M., Nicastro, R. L., & Cardoso De Mendonça, M. J. (2014). Comparação da sensibilidade do ácaro-praga Brevipalpus phoenicis e do predador Agistemus brasiliensis a agroquímicos. *Coffee Science*, 9(1), 102–109. <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/13646>
- Gaba, V., Rosner, A., Maslenin, L., Leibman, D., Singer, S., Kukurt, E., Shibolet, Y.

- M., & Gal-On, A. (2010). Hairpin-based virus resistance depends on the sequence similarity between challenge virus and discrete, highly accumulating siRNA species. *European Journal of Plant Pathology*, *128*(2), 153–164. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9654-5>
- Gal-On, A., & Shibolet, Y. M. (2006). Cross-Protection. *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses*. <https://doi.org/10.1201/9781482270952-12>
- Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Fahlgren, N., Brempelis, K. J., & Carrington, J. C. (2010). Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip mosaic virus infection. *Plant Cell*, *22*(2), 481–496. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.073056>
- Głowacka, K., Kromdijk, J., Leonelli, L., Niyogi, K. K., Clemente, T. E., & Long, S. P. (2016). An evaluation of new and established methods to determine T-DNA copy number and homozygosity in transgenic plants. *Plant Cell and Environment*, *39*(4), 908–917. <https://doi.org/10.1111/pce.12693>
- Gmitter, F. G., & Talon, M. (2008). Citrus genomics. *International Journal of Plant Genomics*. <https://doi.org/10.1155/2008/528361>
- Gonsalves, D. (1998). Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study. *Annual Review of Phytopathology*, *36*(1), 415–437. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.415>
- Goulin, E. H., Galdeano, D. M., Granato, L. M., Matsumura, E. E., Dalio, R. J. D., & Machado, M. A. (2019). RNA interference and CRISPR: Promising approaches to better understand and control citrus pathogens. *Microbiological Research*, *226*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.006>
- Han, Z. F., Hunter, D. M., Sibbald, S., Zhang, J. S., & Tian, L. (2013). Biological activity of the tzs gene of nopaline agrobacterium tumefaciens GV3101 in plant regeneration and genetic transformation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *26*(11), 1359–1365. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-13-0106-R>
- Harrison, S. J., Mott, E. K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. C., & Cottage, A. (2006). A rapid and robust method of identifying transformed Arabidopsis thaliana seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods*, *2*(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-2-19>
- Hesketh, P. M., & Sato, M. E. (2023). Acaricide resistance in predatory mites of the genus Euseius (Acari: Phytoseiidae) and predation capacity on Brevipalpus yothersi (Acari: Tenuipalpidae). *Crop Protection*, *172*, 106322. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2023.106322>
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C. B., Mellen, J. C., ... Colston, B. W. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, *83*(22), 8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>
- Hoang, B. T. L., Fletcher, S. J., Brosnan, C. A., Ghodke, A. B., Manzie, N., & Mitter, N. (2022). RNAi as a Foliar Spray: Efficiency and Challenges to Field Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms23126639>
- Höfle, L., Biedenkopf, D., Werner, B. T., Shrestha, A., Jelonek, L., & Koch, A. (2020). Study on the efficiency of dsRNAs with increasing length in RNA-based silencing of the Fusarium CYP51 genes. *RNA Biology*, *17*(4), 463–473. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1700033>

- Hong, S. M., Bahn, S. C., Lyu, A., Jung, H. S., & Ahn, J. H. (2010). Identification and testing of superior reference genes for a starting pool of transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, *51*(10), 1694–1706. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq128>
- IBGE. (2022). *Produção de laranja*. IBGE (Instituto de Geografia e Estatística). <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/laranja/br>
- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V, Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., & Linsley, P. S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology*, *21*(6), 635–638.
- Jackson, A. L., Burchard, J., Schelter, J., Chau, B. N., Cleary, M., Lim, L., & Linsley, P. S. (2006). Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *Rna*, *12*(7), 1179–1187. <https://doi.org/10.1261/ma.25706>
- Jin, L., Chen, M., Xiang, M., & Guo, Z. (2022). RNAi-Based Antiviral Innate Immunity in Plants. *Viruses*, *14*(2), 432. <https://doi.org/10.3390/v14020432>
- Kalinina, N. O., Khromov, A., Love, A. J., & Taliansky, M. E. (2020). CRISPR applications in plant virology: Virus resistance and beyond. *Phytopathology*, *110*(1), 18–28. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0267-IA>
- Kamola, P. J., Nakano, Y., Takahashi, T., Wilson, P. A., & Ui-Tei, K. (2015). The siRNA Non-seed Region and Its Target Sequences Are Auxiliary Determinants of Off-Target Effects. *PLoS Computational Biology*, *11*(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004656>
- Kanwar, P., Ghosh, S., Sanyal, S. K., & Pandey, G. K. (2022). Identification of Gene Copy Number in the Transgenic Plants by Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). *Methods in Molecular Biology*, *2392*. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1799-1_12
- Kasschau, K. D., & Carrington, J. C. (1998). A Counterdefensive Strategy of Plant Viruses: Suppression of Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell*, *95*(4), 461–470. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81614-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81614-1)
- Khan, Z. A., Kumar, R., & Dasgupta, I. (2022). CRISPR/Cas-Mediated Resistance against Viruses in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms23042303>
- Kitajima, E. W., Carlos, J., Rodrigues, V., & Freitas-Astua, J. (2010). An annotated list of ornamentals naturally found infected by Brevipalpus mite-transmitted viruses. *Scientia Agricola*, *3*, 348–371. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162010000300014>
- Kitajima, E. W., Chagas, C. M., & Rodrigues, J. C. V. (2003). Brevipalpus-transmitted plant virus and virus-like diseases: Cytopathology and some recent cases. *Experimental and Applied Acarology*, *30*(1–3), 135–160. <https://doi.org/10.1023/B:APPA.0000006546.55305.e3>
- Koch, A., Höfle, L., Werner, B. T., Imani, J., Schmidt, A., Jelonek, L., & Kogel, K. H. (2019). SIGS vs HIGS: a study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence *Fusarium FgCYP51* genes in infected host and non-host plants. *Molecular Plant Pathology*, *20*(12), 1636–1644. <https://doi.org/10.1111/mpp.12866>
- Koch, A., & Wassenegger, M. (2021). Host-induced gene silencing mechanisms and applications. *New Phytologist*, *231*, 54–59. <https://doi.org/doi:10.1111/nph.17364>
- Kondo, H., Maeda, T., & Tamada, T. (2003). Orchid Fleck Virus: Brevipalpus californicus Mite Transmission, Biological Properties and Genome Structure. *Experimental and Applied Acarology*, *30*(1–3), 215–223. <https://doi.org/10.1023/B:APPA.0000006550.88615.10>
- Koppert. (2020). *Bioinseticida é a melhor alternativa para controle do vetor do greening*.

- <https://www.koppert.com.br/centro-de-informacoes/noticias/bioinseticida-e-a-melhor-alternativa-para-controlar-do-vetor-do-greening/>
- Labra, M., Vannini, C., Grassi, F., Bracale, M., Balsemin, M., Basso, B., & Sala, F. (2004). Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip. *Theoretical and Applied Genetics*, *109*(7), 1512–1518. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1773-y>
- Leastro, M. O., Castro, D. Y. O., Freitas-Astúa, J., Kitajima, E. W., Pallás, V., & Sánchez-Navarro, J. Á. (2020). Citrus Leprosis Virus C Encodes Three Proteins With Gene Silencing Suppression Activity. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01231>
- Leastro, M. O., Freitas-Astúa, J., Kitajima, E. W., Pallás, V., & Sánchez-Navarro, J. A. (2021). Unravelling the involvement of cilevirus p32 protein in the viral transport. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82453-4>
- León, M. G., Becerra, C. H., Freitas-Astúa, J., Salaroli, R. B., & Kitajima, E. W. (2008). Natural Infection of *Swinglea glutinosa* by the Citrus leprosis virus Cytoplasmic Type (CiLV-C) in Colombia. *Plant Disease*, *92*(9), 1364. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-9-1364C>
- León, M. G., Campos, J. C. P., Guevara, Y. A., & Roy, A. (2023). *Distribución, plantas hospederas y ácaros vectores del virus de la leprosis de los cítricos en Colombia*. AGROSAVIA.
- Lindsey, B. E., Rivero, L., Calhoun, C. S., Grotewold, E., & Brkljacic, J. (2017). Standardized method for high-throughput sterilization of *Arabidopsis* seeds. *Journal of Visualized Experiments*, *128*, 1–7. <https://doi.org/10.3791/56587>
- Liu, G., Lin, Q., Jin, S., & Gao, C. (2022). The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. *Molecular Cell*, *82*(2), 333–347. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.12.002>
- Locali-Fabris, E. C., Freitas-Astúa, J., Souza, A. A., Takita, M. A., Astúa-Monge, G., Antonioli-Luizon, R., Rodrigues, V., Targon, M. L. P. N., & Machado, M. A. (2006). Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type. *Journal of General Virology*, *87*(9), 2721–2729. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82038-0>
- López, C., Cervera, M., Fagoaga, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., & Peña, L. (2010). Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against Citrus tristeza virus in transgenic Mexican lime. *Molecular Plant Pathology*, *11*, 33–41. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00566.x>
- Lück, S., Kreszies, T., Strickert, M., Schweizer, P., Kuhlmann, M., & Douchkov, D. (2019). siRNA-Finder (si-Fi) Software for RNAi-Target Design and Off-Target Prediction. *Frontiers in Plant Science*, *10*(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01023>
- Machado, M. A., Cristofani-Yaly, M., & Bastianel, M. (2011). Breeding, genetic and genomic of citrus for disease resistance. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *33*(SPEC. ISSUE 1), 158–172. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000500019>
- Martínez, F., Lafforgue, G., Morelli, M. J., González-Candelas, F., Chua, N. H., Daròs, J. A., & Elena, S. F. (2012). Ultradeep sequencing analysis of population dynamics of virus escape mutants in RNAi-mediated resistant plants. *Molecular Biology and Evolution*, *29*(11), 3297–3307. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss135>
- Mat Jalaluddin, N. S., Asem, M., Harikrishna, J. A., & Ahmad Fuaad, A. A. H. (2023). Recent Progress on Nanocarriers for Topical-Mediated RNAi Strategies for Crop Protection—A Review. *Molecules*, *28*(6).

- <https://doi.org/10.3390/molecules28062700>
- Mehta, D., Stürchler, A., Anjanappa, R. B., Zaidi, S. S. E. A., Hirsch-Hoffmann, M., Gruissem, W., & Vanderschuren, H. (2019). Linking CRISPR-Cas9 interference in cassava to the evolution of editing-resistant geminiviruses. *Genome Biology*, *20*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1678-3>
- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). (2022). *HIERARQUIZAÇÃO DE PRAGAS DE MAIOR RISCO FITOSSANITÁRIO DO BRASIL*. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-divulga-lista-com-hierarquizacao-de-pragas-de-maior-risco-fitossanitario>
- Mitter, N., Worrall, E. A., Robinson, K. E., Li, P., Jain, R. G., Taochy, C., Fletcher, S. J., Carroll, B. J., Lu, G. Q., & Xu, Z. P. (2017). Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature Plants*, *3*(January). <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.207>
- Mohamed, A., Jin, Z., Osman, T., Shi, N., Tör, M., Jackson, S., & Hong, Y. (2022). Hotspot siRNA Confers Plant Resistance against Viral Infection. *Biology*, *11*(5), 714. <https://doi.org/10.3390/biology11050714>
- Moreira, R. R., Machado, F. J., Lanza, F. E., Trombin, V. G., Bassanezi, R. B., Miranda, M. P., Barbosa, J. C., Silva Junior, G. J., & Behlau, F. (2022). Impact of diseases and pests on premature fruit drop in sweet orange orchards in São Paulo state citrus belt, Brazil. *Pest Management Science*. <https://doi.org/10.1002/ps.6894>
- Musidlak, O., Nawrot, R., & Goździcka-Józefiak, A. (2017). Which plant proteins are involved in antiviral defense? Review on in vivo and in vitro activities of selected plant proteins against viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112300>
- Naito, Y., Yamada, T., Matsumiya, T., Ui-Tei, K., Saigo, K., & Morishita, S. (2005). dsCheck: Highly sensitive off-target search software for double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Nucleic Acids Research*, *33*(SUPPL. 2), 589–591. <https://doi.org/10.1093/nar/gki419>
- Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell*, *2*(4), 279–289. <https://doi.org/10.1105/TPC.2.4.279>
- Navia, D., Novelli, V. M., Rombauts, S., Freitas-Astúa, J., Mendonça, R. S. de, Nunes, M. A., Machado, M. A., Lin, Y.-C., Le, P., Zhang, Z., Grbić, M., Wybouw, N., Breeuwer, J. A. J., Leeuwen, T. Van, & Peer, Y. Van de. (2019). Draft Genome Assembly of the False Spider Mite *Brevipalpus yothersi*. *Microbiology Resource Announcements*, *8*(6). <https://doi.org/10.1128/MRA.01563-18>
- Neumeier, J., & Meister, G. (2021). siRNA Specificity: RNAi Mechanisms and Strategies to Reduce Off-Target Effects. *Frontiers in Plant Science*, *11*(January), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.526455>
- Nishimura, M. T., & Dangl, J. L. (2010). Arabidopsis and the Plant Immune System. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *61*(6), 1053. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2010.04131.X>
- Niu, J., Shen, G., Christiaens, O., Smagghe, G., He, L., & Wang, J. (2018). Beyond insects: current status and achievements of RNA interference in mite pests and future perspectives. *Pest Management Science*, *74*(12), 2680–2687. <https://doi.org/10.1002/ps.5071>
- Niu, Q. W., Lin, S. S., Reyes, J. L., Chen, K. C., Wu, H. W., Yeh, S. D., & Chua, N. H. (2006). Expression of artificial microRNAs in transgenic Arabidopsis thaliana confers virus resistance. *Nature Biotechnology*, *24*(11), 1420–1428. <https://doi.org/10.1038/nbt1255>

- Nomura, K., Ohshima, K., Anai, T., Uekusa, H., & Kita, N. (2004). RNA silencing of the introduced coat protein gene of Turnip mosaic virus confers broad-spectrum resistance in transgenic Arabidopsis. *Phytopathology*, *94*(7), 730–736. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.7.730>
- Nunes, M. A., Bergamini, M. P., Coerini, L. F., Bastianel, M., Novelli, V. M., Kitajima, E. W., & Freitas-Astúa, J. (2012). Citrus leprosis virus C Naturally Infecting Commelina benghalensis, a Prevalent Monocot Weed of Citrus Orchards in Brazil. *Plant Disease*, *96*(5), 770–770. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-11-0925-PDN>
- Nunes, M. A., De Carvalho Mineiro, J. L., Rogerio, L. A., Ferreira, L. M., Tassi, A., Novelli, V. M., Kitajima, E. W., & Freitas-Astúa, J. (2018). First Report of Brevipalpus papayensis as Vector of Coffee ringspot virus and Citrus leprosis virus C. *Plant Disease*, *102*(5), 1046. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1000-PDN>
- Oliveira, P. R., Soares, S. F. W., Machado, M. A., Ferreira, A. E., Scivittaro, B. W., & Gesteira, A. S. (2014). Melhoramento genético de plantas cítricas. *Informe Agropecuário*, *35*(281), 22–29.
- Oliver, J., Rotenberg, D., Agosto-Shaw, K., McInnes, H. A., Lahre, K. A., Mulot, M., Adkins, S., & Whitfield, A. (2023). Multigenic hairpin transgenes in tomato confer resistance to multiple orthotospoviruses including Sw-5 resistance-breaking tomato spotted wilt virus. *Phytopathology*®, *X*(X), 1–13. <https://doi.org/10.1094/phyto-07-23-0256-kc>
- Olmedo-Velarde, A., Roy, A., Padmanabhan, C., Nunziata, S., Nakhla, M. K., & Melzer, M. J. (2021). *First Report of Orchid Fleck Virus Associated with Citrus Leprosis Symptoms in Rough Lemon (Citrus jambhiri) and Mandarin (C. reticulata) the United States*. 0–1. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2736-PDN>
- Olmedo Velarde, A., Larrea-Sarmiento, A., Wang, X., Hu, J. S., & Melzer, M. J. (2023). A breakthrough in kitavirids: genetic variability, reverse-genetics, Koch's postulates and transmission of hibiscus green spot virus 2. *Phytopathology*®. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-23-0110-R>
- Parent, J. S., Bouteiller, N., Elmayan, T., & Vaucheret, H. (2015). Respective contributions of Arabidopsis DCL2 and DCL4 to RNA silencing. *Plant Journal*, *81*(2), 223–232. <https://doi.org/10.1111/tpj.12720>
- Pascon, R. C., Kitajima, J. P., Breton, M. C., Assumpção, L., Greggio, C., Zanca, A. S., Okura, V. K., Alegria, M. C., Camargo, M. E., Silva, G. G. C., Cardozo, J. C., Vallim, M. A., Franco, S. F., Silva, V. H., Jordão, H., Oliveira, F., Giachetto, P. F., Ferrari, F., Aguilar-Vildoso, C. I., ... Da Silva, A. C. R. (2006). The complete nucleotide sequence and genomic organization of Citrus Leprosis associated Virus, Cytoplasmatic type (CiLV-C). *Virus Genes*, *32*(3), 289–298. <https://doi.org/10.1007/S11262-005-6913-1>
- Pomerantz, A. F., & Hoy, M. A. (2015). RNAi-mediated knockdown of transformer-2 in the predatory mite Metaseiulus occidentalis via oral delivery of double-stranded RNA. *Experimental & Applied Acarology*, *65*(1), 17–27. <https://doi.org/10.1007/S10493-014-9852-5>
- Price, A. A., Sampson, T. R., Ratner, H. K., Grakoui, A., & Weiss, D. S. (2015). Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(19), 6164–6169. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422340112>
- Quito-Avila, D. F., Freitas-Astúa, J., & Melzer, M. J. (2021). Bluner-, Cile-, and Higreviruses (Kitaviridae). In *Encyclopedia of Virology* (pp. 247–251). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.21248-x>
- Ramos-González, P. L., Arena, G. D., Tassi, A. D., Chabi-Jesus, C., Kitajima, E. W., &

- Freitas-Astúa, J. (2023). Kitaviruses: A Window to Atypical Plant Viruses Causing Nonsystemic Diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 61(1), 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021622-121351>
- Ramos-González, P. L., Chabi-Jesus, C., Arena, G. D., Tassi, A. D., Kitajima, E. W., & Freitas-Astúa, J. (2018). Citrus leprosis: a unique multietiological disease. *Citrus in the Americas*, 1(1), 4–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.6084/m9.figshare.13513857.v2>
- Ramos-González, P. L., Chabi-Jesus, C., Guerra-Peraza, O., Breton, M. C., Arena, G. D., Nunes, M. A., Kitajima, E. W., Machado, M. A., & Freitas-Astúa, J. (2016). Phylogenetic and molecular variability studies reveal a new genetic clade of Citrus leprosis virus C. *Viruses*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/v8060153>
- Ramos-González, P. L., Chabi-Jesus, C., Guerra-Peraza, O., Tassi, A. D., Kitajima, E. W., Harakava, R., Salaroli, R. B., & Freitas-Astúa, J. (2017). Citrus leprosis virus N: A new dichorhavirus causing Citrus leprosis disease. *Phytopathology*, 107(8), 963–976. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0042-R>
- Ramos-González, P. L., Pons, T., Chabi-Jesus, C., Arena, G. D., & Freitas-Astúa, J. (2021). Poorly Conserved P15 Proteins of Cileviruses Retain Elements of Common Ancestry and Putative Functionality: A Theoretical Assessment on the Evolution of Cilevirus Genomes. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.771983>
- Ramos-González, P. L., Santos, G. F. dos, Chabi-Jesus, C., Harakava, R., Kitajima, E. W., & Freitas-Astúa, J. (2020). Passion Fruit Green Spot Virus Genome Harbors a New Orphan ORF and Highlights the Flexibility of the 5'-End of the RNA2 Segment Across Cileviruses. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00206>
- Rank, A. P., & Koch, A. (2021). Lab-to-Field Transition of RNA Spray Applications – How Far Are We? *Frontiers in Plant Science*, 12(October). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.755203>
- Reyes, C. A., De Francesco, A., Peña, E. J., Costa, N., Plata, M. I., Sendin, L., Castagnaro, A. P., & García, M. L. (2011). Resistance to Citrus psorosis virus in transgenic sweet orange plants is triggered by coat protein-RNA silencing. *Journal of Biotechnology*, 151(1), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.11.007>
- Robertson, G., Burger, J., & Campa, M. (2022). CRISPR/Cas-based tools for the targeted control of plant viruses. *Molecular Plant Pathology*, 23(11), 1701–1718. <https://doi.org/10.1111/mpp.13252>
- Rocha, C. M., Della Vechia, J. F., Savi, P. J., Omoto, C., & Andrade, D. J. (2021). Resistance to spirodiclofen in *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae) from Brazilian citrus groves: detection, monitoring, and population performance. *Pest Management Science*, 77(7), 3099–3106. <https://doi.org/10.1002/PS.6341>
- Rodrigues, M. da C. (2022). *Caracterização de um novo agente causal associado a manchas cloróticas em citros*. Instituto Biológico, São Paulo, Brasil.
- Rodrigues, V., Bastianel, M., Kubo, K., Fadel, A. L., Nicolini, F., Novelli, V. M., & Freitas-Astúa, J. (2007). Desenvolvimento de um método para a otimização da transmissão experimental do vírus da leprose dos citros. *Laranja*, 28(12), 29–38. <https://citrusrt.cesm.br/article/5e57b32b0e882556195d5a13/pdf/citrusrt-28-1-2-5e57b32b0e882556195d5a13.pdf>
- Rossi, M. (2022). *Isaria fumosorosea x ácaro da leprose dos citros*. <https://revistacampoenegocios.com.br/isaria-fumosorosea-x-acaro-da-leprose-dos-citros/>
- Roy, A., Choudhary, N., Guillermo, L. M., Shao, J., Govindarajulu, A., Achor, D., Wei,

- G., Picton, D. D., Levy, L., Nakhla, M. K., Hartung, J. S., & Brlansky, R. H. (2013). A novel virus of the genus Cilevirus causing symptoms similar to Citrus leprosis. *Phytopathology*, *103*(5), 488–500. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-12-0177-R>
- Roy, A., León, M. G., Stone, A. L., Schneider, W. L., Hartung, J. S., & Brlansky, R. H. (2014). First report of Citrus leprosis virus nuclear type in sweet orange in Colombia. *Plant Disease*, *98*(8), 1162. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0117-PDN>
- Sarbaz, S., Goldasteh, S., Zamani, A. A., Solymannejadiyan, E., & Vafaei Shoushtari, R. (2017). Side effects of spiromesifen and spiroadiclofen on life table parameters of the predatory mite, *Neoseiulus californicus* McGregor (Acari: Phytoseiidae). *International Journal of Acarology*, *43*(5), 380–386. <https://doi.org/10.1080/01647954.2017.1325396>
- Senthil-Kumar, M., Hema, R., Anand, A., Kang, L., Udayakumar, M., & Mysore, K. S. (2007). A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. *New Phytologist*, *176*(4), 782–791. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02225.x>
- Senthil-Kumar, M., & Mysore, K. S. (2011). Caveat of RNAi in Plants: The Off-Target Effect. *Methods in Molecular Biology*, *744*, 13–25. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-123-9_2/COVER
- Sharma, V. K., Marla, S., Zheng, W., Mishra, D., Huang, J., Zhang, W., Morris, G. P., & Cook, D. E. (2022). CRISPR guides induce gene silencing in plants in the absence of Cas. *Genome Biology*, *23*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02586-7>
- Silva, M. Z. da, Sato, M. ., Oliveira, C. A. L. de, & Veronez, B. (2012). Toxicidade de agroquímicos ao ácaro-da-leprose dos citros *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) e ao ácaro predador *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Tenuipalpidae, Phytoseiidae). *Arquivos Do Instituto Biológico*, *79*(3), 363–370. <https://doi.org/10.1590/S1808-16572012000300006>
- Silva, M. Z. da, Sato, M. E., Oliveira, C. A. L. de, & Rais, D. S. (2011). Toxicidade diferencial de agrotóxicos utilizados em citros para *Neoseiulus californicus*, *Euseius concordis* e *Brevipalpus phoenicis*. *Bragantia*, *70*(1), 87–95. <https://doi.org/10.1590/s0006-87052011000100014>
- Smith, N. A., Singh, S. P., Wang, M. B., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G., & Waterhouse, P. M. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, *407*(6802), 319–320. <https://doi.org/10.1038/35030305>
- Soler, N., Fagoaga, C., Chiibi, S., López, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., & Peña, L. (2011). RNAi-Mediated Protection Against Citrus Tristeza Virus in Transgenic Citrus Plants. *RNA Technology, Non Coding*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-19454-2>
- Soler, N., Plomer, M., Fagoaga, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., & Peña, L. (2012). Transformation of Mexican lime with an intron-hairpin construct expressing untranslatable versions of the genes coding for the three silencing suppressors of Citrus tristeza virus confers complete resistance to the virus. *Plant Biotechnology Journal*, *10*, 597–608. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00691.x>
- Souza, T. L. P. O., Faria, J. C., Aragão, F. J. L., Del Peloso, M. J., Faria, L. C., Wendland, A., Aguiar, M. S., Quintela, E. D., Melo, C. L. P., Hungria, M., Vianello, R. P., Pereira, H. S., & Melo, L. C. (2018). Agronomic performance and yield stability of the RNA interference-based Bean golden mosaic virus-resistant common bean. *Crop Science*, *58*(2), 579–591. <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.06.0355>
- Sun, L., Nasrullah, Ke, F., Nie, Z., Wang, P., & Xu, J. (2019). Citrus genetic engineering for disease resistance: past, present and future. *International Journal of Molecular*

- Sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215256>
- Suzuki, T., Nunes, M. A., España, M. U., Namin, H. H., Jin, P., Bensoussan, N., Zhurov, V., Rahman, T., Clercq, R. De, Hilson, P., Grbic, V., & Grbic, M. (2017). RNAi-based reverse genetics in the chelicerate model *Tetranychus urticae*: A comparative analysis of five methods for gene silencing. *PLoS ONE*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180654>
- Taliansky, M., Samarskaya, V., Zavriev, S. K., Fesenko, I., Kalinina, N. O., & Love, A. J. (2021). Rna-based technologies for engineering plant virus resistance. *Plants*, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.3390/plants10010082>
- Tan, X., Zhang, D., Wintgens, C., Willingmann, P., Adam, G., & Heinze, C. (2012). A Comparative Testing of <i>Cucurbit mosaic virus</i> (CMV)-Based Constructs to Generate Virus Resistant Plants. *American Journal of Plant Sciences*, 03(04), 461–472. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.34055>
- Tassi, A. D., Garita-Salazar, L. C., Amorim, L., Novelli, V. M., Freitas-Astúa, J., Childers, C. C., & Kitajima, E. W. (2017). Virus-vector relationship in the Citrus leprosis pathosystem. *Experimental and Applied Acarology*, 71(3), 227–241. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0123-0>
- Tassi, A. D., Ramos-González, P. L., Sinico, T. E., Kitajima, E. W., & Freitas-Astúa, J. (2022). Circulative Transmission of Cileviruses in Brevipalpus Mites May Involve the Paracellular Movement of Virions. *Frontiers in Microbiology*, 13(April). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.836743>
- Team, P. (2023). *RStudio: Integrated Development for R*. Posit Software, PBC, Boston, MA. <http://www.posit.co/>
- Thorat, Y. E., Dutta, T. K., Jain, P. K., Subramaniam, K., & Sirohi, A. (2024). A nematode-inducible promoter can effectively drives RNAi construct to confer *Meloidogyne incognita* resistance in tomato. *Plant Cell Reports*, 43(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00299-023-03114-6>
- Vázquez-Benito, J. A., Santillán-Galicia, M. T., Guzmán-Franco, A. W., Hernández-Domínguez, C., Romero-Rosales, F., Ortiz-Osuna, Á., & Rodríguez-Maciél, J. C. (2022). Combined application of predatory mites and fungal pathogens for biological control of *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae) under laboratory conditions. *Biological Control*, 167. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104853>
- Vechia, J. F. Della, Kapp, A. B. P., & Rocha, C. M. da. (2022). The importance of acaricides in the control of citrus leprosis mite and factors that interfere with the efficacy. *Citrus Research & Technology*, 43. <https://doi.org/10.4322/crt.23021>
- Weeks, A. R., Marec, F., & Breeuwer, J. A. J. (2001). A mite species that consists entirely of haploid females. *Science*, 292(5526), 2479–2482. <https://doi.org/10.1126/science.1060411>
- Wei, P., Wang, C., Li, C., Chen, M., Sun, J., Van Leeuwen, T., & He, L. (2021). Comparing the efficiency of RNAi after feeding and injection of dsRNA in spider mites. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 179, 104966. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2021.104966>
- Weng, H., Pan, A., Yang, L., Zhang, C., Liu, Z., & Zhang, D. (2004). Estimating number of transgene copies in transgenic rapeseed by real-time PCR assay with HMG I/Y as an endogenous reference gene. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(3), 289–300. <https://doi.org/10.1007/BF02773139>
- Wu, K., & Hoy, M. A. (2014). Clathrin Heavy Chain Is Important for Viability, Oviposition, Embryogenesis and, Possibly, Systemic RNAi Response in the Predatory Mite *Metaseiulus occidentalis*. *PLOS ONE*, 9(10), e110874.

- <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0110874>
- Xu, P., Zhang, Y., Kang, L., Roossinck, M. J., & Mysore, K. S. (2006). Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiology*, *142*(2), 429–440. <https://doi.org/10.1104/pp.106.083295>
- Yang, X., Niu, L., Zhang, W., He, H., Yang, J., Xing, G., Guo, D., Du, Q., Qian, X., Yao, Y., Li, Q., & Dong, Y. (2017). Robust RNAi-mediated resistance to infection of seven potyvirids in soybean expressing an intron hairpin NIB RNA. *Transgenic Research*, *26*(5), 665–676. <https://doi.org/10.1007/s11248-017-0041-2>
- Yang, Z., & Li, Y. (2018). Dissection of RNAi-based antiviral immunity in plants. *Current Opinion in Virology*, *32*, 88–99. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2018.08.003>
- Yoshikawa, M., Han, Y. W., Fujii, H., Aizawa, S., Nishino, T., & Ishikawa, M. (2021). Cooperative recruitment of RDR6 by SGS3 and SDE5 during small interfering RNA amplification in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(34), 1–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.2102885118>
- Zhang, H., Xia, R., Meyers, B. C., & Walbot, V. (2015). Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins. *Current Opinion in Plant Biology*, *27*, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.06.011>
- Zhang, T., Zhao, Y., Ye, J., Cao, X., Xu, C., Chen, B., An, H., Jiao, Y., Zhang, F., Yang, X., & Zhou, G. (2019). Establishing CRISPR/Cas13a immune system conferring RNA virus resistance in both dicot and monocot plants. *Plant Biotechnology Journal*, *17*(7), 1185–1187. <https://doi.org/10.1111/pbi.13095>
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nature Protocols*, *1*(2), 641–646. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>
- Zhang, X., Sato, S., Ye, X., Dorrance, A. E., Jack Morris, T., Clemente, T. E., & Qu, F. (2011). Robust RNAi-based resistance to mixed infection of three viruses in soybean plants expressing separate short hairpins from a single transgene. *Phytopathology*, *101*(11), 1264–1269. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-11-0056>
- Zhao, S., & Fernald, R. D. (2005). Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *JOURNAL OF COMPUTATIONAL BIOLOGY*, *12*(8).

9 TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela complementar 1: Predição de alvos não específicos do fragmento MET-hp de CiLV-C em *Arabidopsis thaliana* pela ferramenta dsCheck. Mis: *mismatch* (incompatibilidade de nucleotídeos).

Mis=0	Mis=1	Mis=2	Nome da possível sequência fora do alvo
0	2	3	NM_122494.2 <i>A. thaliana</i> leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein (At5g25930)
0	1	8	NM_120003.2 <i>A. thaliana</i> dehydrin, putative (At4g38410)
0	1	5	NM_114844.3 <i>A. thaliana</i> proline-rich family protein (At3g49840)
0	1	3	NM_114486.1 <i>A. thaliana</i> short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein (At3g46170)
0	1	3	NM_125493.2 <i>A. thaliana</i> replication protein, putative (At5g61000)
0	1	2	NM_117076.2 <i>A. thaliana</i> expressed protein (At4g10080)
0	0	2	NM_102912.2 <i>A. thaliana</i> conserved oligomeric Golgi complex component-related / COG complex component-related (At1g31780)
0	0	5	NM_104489.2 <i>A. thaliana</i> nucleolar protein Nop56, putative (At1g56110)
0	0	4	NM_118560.3 <i>A. thaliana</i> RNA recognition motif (RRM)-containing protein (At4g24270)
0	0	4	NM_121950.2 <i>A. thaliana</i> calcium-dependent protein kinase 19 (CDPK19) (At5g19450)
0	0	4	NM_180522.1 <i>A. thaliana</i> calcium-dependent protein kinase 19 (CDPK19) (At5g19450)
0	0	4	NM_105014.1 <i>A. thaliana</i> disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative (At1g63350)
0	0	4	NM_129647.3 <i>A. thaliana</i> glycoside hydrolase family 77 protein (At2g40840)
0	0	4	NM_120723.1 <i>A. thaliana</i> pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein (At5g06400)
0	0	4	NM_118621.2 <i>A. thaliana</i> calcineurin-like phosphoesterase family protein (At4g24890)
0	0	4	NM_179220.1 <i>A. thaliana</i> RNA recognition motif (RRM)-containing protein (At4g24270)
0	0	4	NM_114774.2 <i>A. thaliana</i> F-box family protein (At3g49150)
0	0	4	NM_102573.2 <i>A. thaliana</i> expressed protein (At1g28080)
0	0	4	NM_116424.1 <i>A. thaliana</i> DC1 domain-containing protein (At4g01930)
0	0	4	NM_105611.2 <i>A. thaliana</i> PAZ domain-containing protein / piwi domain-containing protein (At1g69440)
0	0	3	NM_123298.3 <i>A. thaliana</i> circadian clock coupling factor-related (At5g39360)
0	0	3	NM_128621.1 <i>A. thaliana</i> expressed protein (At2g30690)
0	0	3	NM_122538.3 <i>A. thaliana</i> glycoside hydrolase starch-binding domain-containing protein (At5g26570)
0	0	3	NM_202190.1 <i>A. thaliana</i> nitrate transporter, putative (At1g27040)
0	0	3	NM_100763.3 <i>A. thaliana</i> zinc finger (MIZ type) family protein (At1g08910)
0	0	3	NM_102466.3 <i>A. thaliana</i> nitrate transporter, putative (At1g27040)
0	0	3	NM_180659.1 <i>A. thaliana</i> prefoldin-related KE2 family protein (At2g07340)
0	0	3	NM_120795.3 <i>A. thaliana</i> laccase, putative / diphenol oxidase, putative (At5g07130)
0	0	3	NM_121900.1 <i>A. thaliana</i> pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein (At5g18950)
0	0	3	NM_125940.1 <i>A. thaliana</i> cyclin, putative (At5g65420)

Tabela suplementar 2: Predição de alvos não específicos do fragmento RdRp2-hp de CiLV-C em *Arabidopsis thaliana* pela ferramenta dsCheck. Mis: *mismatch* (incompatibilidade de nucleotídeos).

Mis=0	Mis=1	Mis=2	Nome da possível sequência fora do alvo
0	3	3	NM_119112.2 <i>A. thaliana</i> thioredoxin family protein (At4g29670)
0	2	3	NM_127584.1 <i>A. thaliana</i> hypothetical protein (At2g20250)
0	2	3	NM_103169.2 <i>A. thaliana</i> permease-related (At1g34470)
0	2	3	NM_125013.3 <i>A. thaliana</i> S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein (At5g56300)
0	2	2	NM_121366.3 <i>A. thaliana</i> magnesium-chelatase subunit chlH, chloroplast, putative / Mg-protoporphyrin IX chelatase, putative (CHLH) (At5g13630)
0	1	5	NM_101608.3 <i>A. thaliana</i> myb family transcription factor (At1g17460)
0	1	4	NM_128319.2 <i>A. thaliana</i> AAA-type ATPase family protein / vacuolar sorting protein-related (At2g27600)
0	1	3	NM_119143.1 <i>A. thaliana</i> F-box family protein (At4g29970)
0	1	2	NM_122342.2 <i>A. thaliana</i> 3'-5' exonuclease domain-containing protein (At5g24340)
0	0	7	NM_120548.2 <i>A. thaliana</i> cytochrome P450, putative (At5g04660)
0	0	7	NM_179487.1 <i>A. thaliana</i> elongation factor 2, putative / EF-2, putative (At1g56070)
0	0	5	NM_119116.1 <i>A. thaliana</i> phosphodiesterase/nucleotide pyrophosphatase-related (At4g29710)
0	0	5	NM_122537.2 <i>A. thaliana</i> chaperonin, putative (At5g26360)
0	0	5	NM_180065.1 <i>A. thaliana</i> expressed protein (At2g43630)
0	0	5	NM_111892.2 <i>A. thaliana</i> cytochrome P450, putative (At3g10560)
0	0	4	NM_100907.1 <i>A. thaliana</i> pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein (At1g10330)
0	0	4	NM_111319.2 <i>A. thaliana</i> endoribonuclease L-PSP family protein (At3g04480)
0	0	4	NM_129533.3 <i>A. thaliana</i> dehydration-responsive family protein (At2g39750)
0	0	3	NM_129419.3 <i>A. thaliana</i> cell division control protein, putative (At2g38620)
0	0	3	NM_122264.3 <i>A. thaliana</i> calcium-dependent protein kinase 9 (CDPK9) (At5g23580)
0	0	3	NM_115523.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> exocyst complex subunit Sec15-like family protein (At3g56640)
0	0	3	NM_129754.2 <i>A. thaliana</i> zinc finger (CCCH-type) family protein (At2g41900)
0	0	3	NM_103018.1 <i>A. thaliana</i> Ulp1 protease family protein (At1g32840)
0	0	3	NM_128364.1 <i>A. thaliana</i> pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein (At2g28050)
0	0	3	NM_103651.2 <i>A. thaliana</i> lipoyltransferase, putative (At1g47580)
0	0	3	NM_111677.3 <i>A. thaliana</i> protein kinase, putative (At3g07980)
0	0	3	NM_102456.2 <i>A. thaliana</i> expressed protein (At1g26920)
0	0	3	NM_114567.2 <i>A. thaliana</i> glycosyl hydrolase family 3 protein (At3g47000)
0	0	3	NM_112199.2 <i>A. thaliana</i> MAP3K epsilon protein kinase (At3g13530)
0	0	3	NM_126133.2 <i>A. thaliana</i> NRAMP metal ion transporter 4 (NRAMP4) (At5g67330)

Tabela suplementar 3: Predição de alvos não específicos do fragmento p15-hp de CiLV-C em *Arabidopsis thaliana* pela ferramenta dsCheck. Mis: *mismatch* (incompatibilidade de nucleotídeos).

Mis=0	Mis=1	Mis=2	Nome da possível sequência fora do alvo
0	2	2	NM_100757.2 A. thaliana superoxide dismutase [Cu-Zn] (SODCC) / copper/zinc superoxide dismutase (CSD1) (At1g08830)
0	1	4	NM_100699.1 A. thaliana DNA-directed DNA polymerase epsilon catalytic subunit, putative (At1g08260)
0	1	2	NM_117795.1 A. thaliana disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative (At4g16920)
0	1	2	NM_121547.1 A. thaliana calmodulin-binding protein-related (At5g15430)
0	1	2	NM_125793.4 A. thaliana copine-related (At5g63970)
0	1	2	NM_117792.1 A. thaliana disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative (At4g16890)
0	0	5	NM_114225.1 A. thaliana GDSL-motif lipase, putative (At3g43570)
0	0	5	NM_148603.1 A. thaliana GDSL-motif lipase, putative (At1g58725)
0	0	4	NM_122282.1 A. thaliana agenet domain-containing protein (At5g23770)
0	0	4	NM_105709.2 A. thaliana carbonic anhydrase, putative / carbonate dehydratase, putative (At1g70410)
0	0	4	NM_202390.1 A. thaliana carbonic anhydrase, putative / carbonate dehydratase, putative (At1g70410)
0	0	4	NM_179541.2 A. thaliana carbonic anhydrase, putative / carbonate dehydratase, putative (At1g70410)
0	0	4	NM_114637.3 A. thaliana microtubule-associated EB1 family protein (At3g47690)
0	0	4	NM_112770.1 A. thaliana pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein (At3g18840)
0	0	3	NM_125723.2 A. thaliana zinc finger (C2H2 type) family protein (At5g63280)
0	0	3	NM_130347.2 A. thaliana glutathione-conjugate transporter (MRP4) (At2g47800)
0	0	3	NM_118448.3 A. thaliana protein kinase family protein (At4g23190)
0	0	3	NM_115638.1 A. thaliana expressed protein (At3g57780)
0	0	3	NM_119500.4 A. thaliana ABC transporter family protein (At4g33460)
0	0	3	NM_112167.2 A. thaliana expressed protein (At3g13230)
0	0	3	NM_148280.1 A. thaliana hypothetical protein (At4g08056)
0	0	3	NM_112619.1 A. thaliana F-box family protein (At3g17400)
0	0	3	NM_116327.4 A. thaliana transcription factor jumonji (jmjC) domain-containing protein (At4g00990)
0	0	3	NM_148309.1 A. thaliana hypothetical protein (At4g10695)
0	0	3	NM_122740.1 A. thaliana hypothetical protein (At5g28570)
0	0	2	NM_116080.1 A. thaliana multidrug resistant (MDR) ABC transporter, putative (At3g62150)
0	0	2	NM_103060.2 A. thaliana peptide chain release factor, putative (At1g33330)
0	0	2	NM_114929.2 A. thaliana leucine-rich repeat family protein (At3g50690)
0	0	2	NM_115352.3 A. thaliana patatin-related (At3g54950)
0	0	2	NM_104079.2 A. thaliana mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative (At1g51980)

Tabela suplementar 4: Resultados obtidos por qPCR demonstrando a carga viral nas plantas selvagens e transgênicas após o desafio com ácaros virulíferos para CiLV-C SJP.

Desafio	Linagem	Carga viral (\pmEP*)
1	WT	6,51E+07 \pm 1,41E+07
	RdRp2-hp_39	1,94E+07 \pm 6,84E+06
	MET-hp_115	2,57E+07 \pm 7,63E+06
	MET-hp_117	1,51E+07 \pm 6,65E+06
2	WT	2,08E+09 \pm 4,20E+08
	RdRp2-hp_70	4,01E+04 \pm 1,26E+04
	RdRp2-hp_83	1,16E+08 \pm 5,64E+07
	MET-hp_109	5,02E+07 \pm 1,90E+07
3	WT	2,86E+09 \pm 5,51E+08
	RdRp2-hp_92	1,56E+08 \pm 8,12E+07
	p15-hp_88	4,33E+09 \pm 1,13E+09
	p15-hp_89	2,65E+08 \pm 5,73E+07
4	WT	7,22E+08 \pm 1,06E+08
	MET-hp_112	6,18E+08 \pm 1,05E+08
	p15-hp_44	8,75E+07 \pm 1,77E+07
	p15-hp_69	5,76E+07 \pm 1,72E+07
	p15-hp_100	8,67E+08 \pm 1,94E+07

* EP = erro padrão da média

10 FIGURAS SUPLEMENTARES

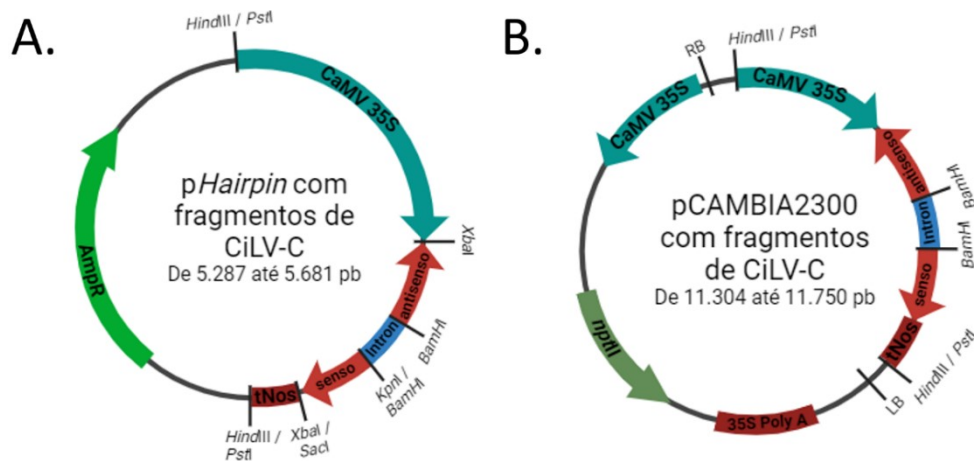


Figura suplementar 1: **A.** Representação de alguns elementos do plasmídeo *pHairpin*. A unidade transcricional de interesse contém: promotor *35S* do *CaMV*, íntron da catalase de folha de batata, *tNos*, os fragmentos virais no sentido antisenso e senso e o gene para resistência ao antibiótico ampicilina. Apenas as enzimas relevantes para a clonagem dos fragmentos virais nos sentidos antisenso e senso estão indicadas. **B.** Representação de alguns elementos do vetor binário *pCAMBIA2300* contendo as unidades transcricionais com os fragmentos virais inseridos e que confere resistência ao antibiótico canamicina (gene *nptII*). RB: borda direita. Primeira unidade transcricional contém o promotor *35S*, fragmento viral derivado de *CiLV-C* antisenso, íntron da catalase da folha de batata, fragmento viral de *CiLV-C* senso e *tNos*. LB: borda esquerda. Segunda unidade transcricional contendo promotor *35S*, gene *nptII* e *35S PolyA* (sinal de poliadenilação do *35S*). Apenas as enzimas utilizadas para a confirmação da construção estão indicadas. O tamanho de cada gene não condiz com a escala real.

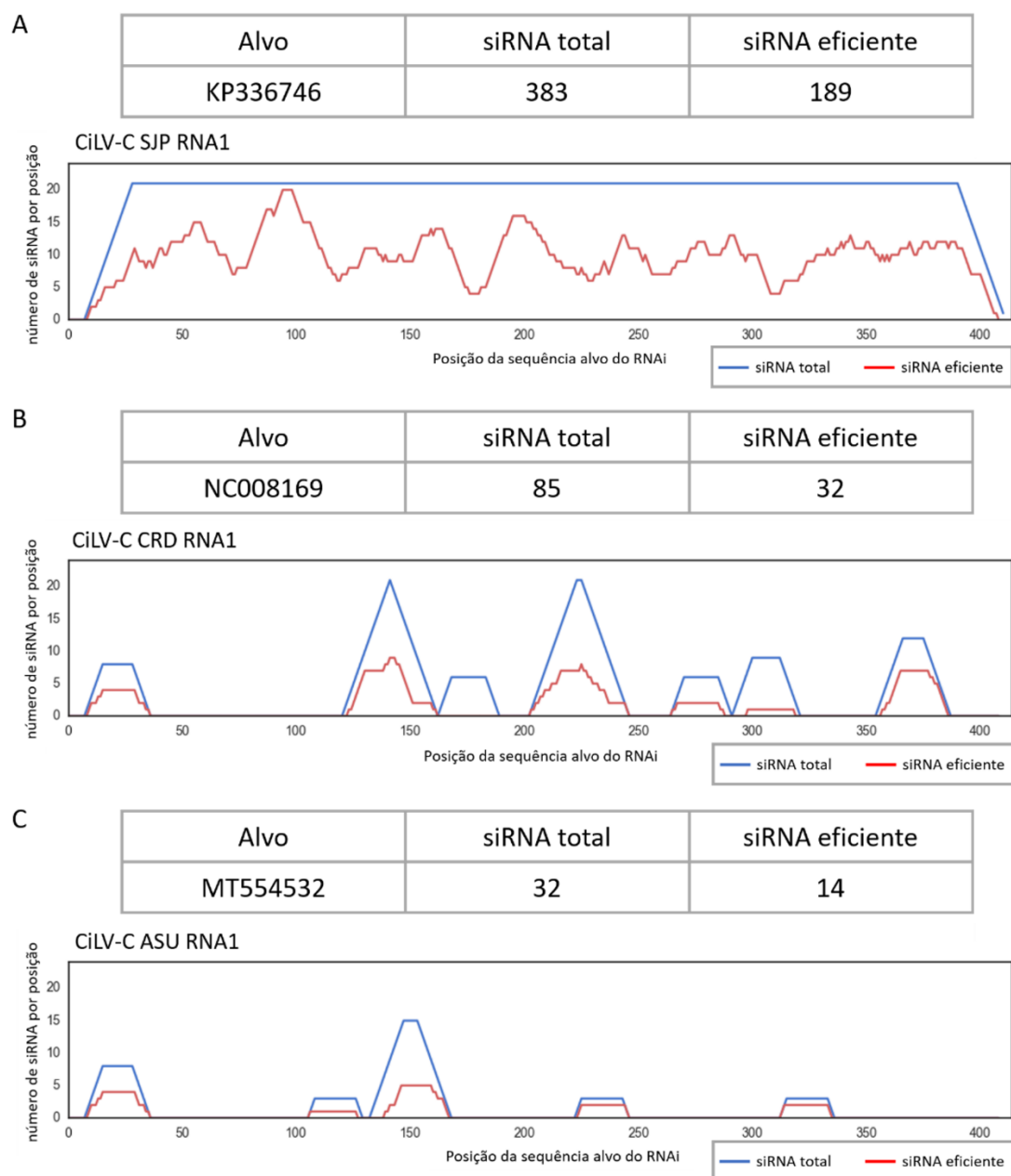


Figura suplementar 2: Análise *in silico* do fragmento MET-hp de CiLV-C pelo programa si-Fi (siRNA-Finder) (Lück et al., 2019). Na coluna Alvo está indicado o número de acesso da sequência em análise. **A.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA1 da estirpe SJP. **B.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA1 da estirpe CRD. **C.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA1 da estirpe ASU.

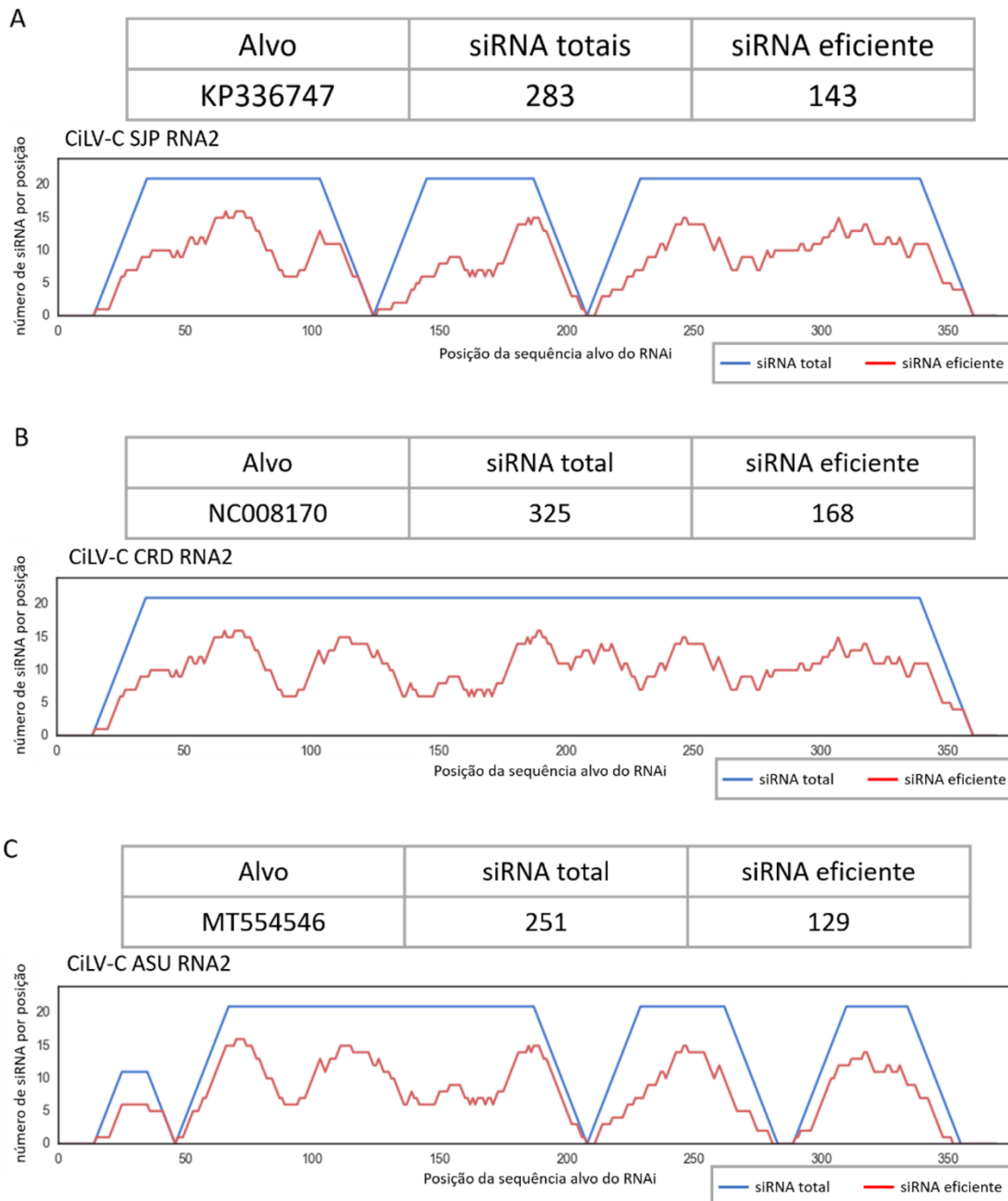


Figura suplementar 3: Análise *in silico* do fragmento p15-hp de CiLV-C pelo programa si-Fi (siRNA-Finder) (Lück et al., 2019). Na coluna Alvo está indicado o número de acesso da sequência em análise. **A.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA2 da estirpe SJP. **B.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA2 da estirpe CRD. **C.** Identificação de siRNAs totais e eficientes na sequência do RNA2 da estirpe ASU.

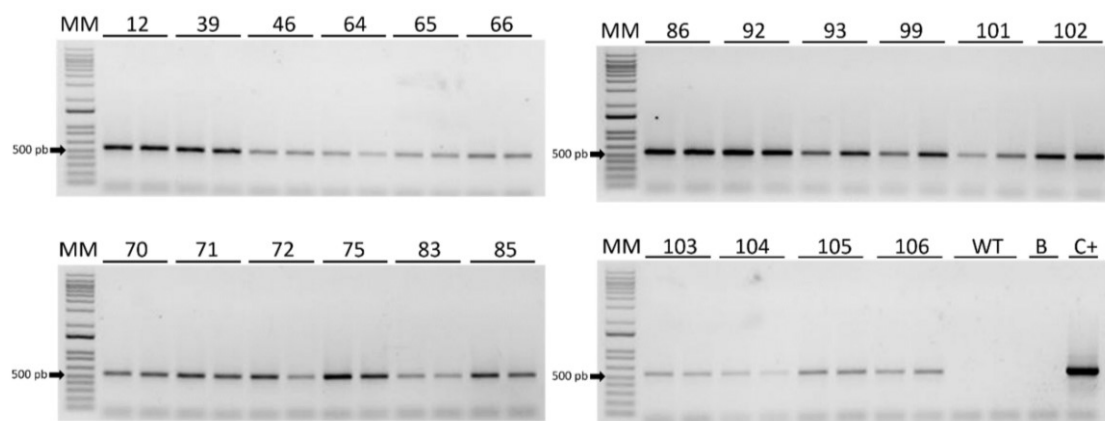


Figura suplementar 4: Géis de agarose (0,8%) evidenciando os resultados da PCR realizada para a avaliação das plantas RdRp-hp utilizando iniciadores para a amplificação de um fragmento do gene *RdRp2*-hp de 567 pb. MM: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). Números na parte superior dos géis indicam a identificação de cada linhagem transgênica. Cada planta foi analisada em duplicata. WT: arabisopsis selvagem (controle negativo). B: branco da PCR. C+: plasmídeo pCAMBIA2300/RdRp-hp.

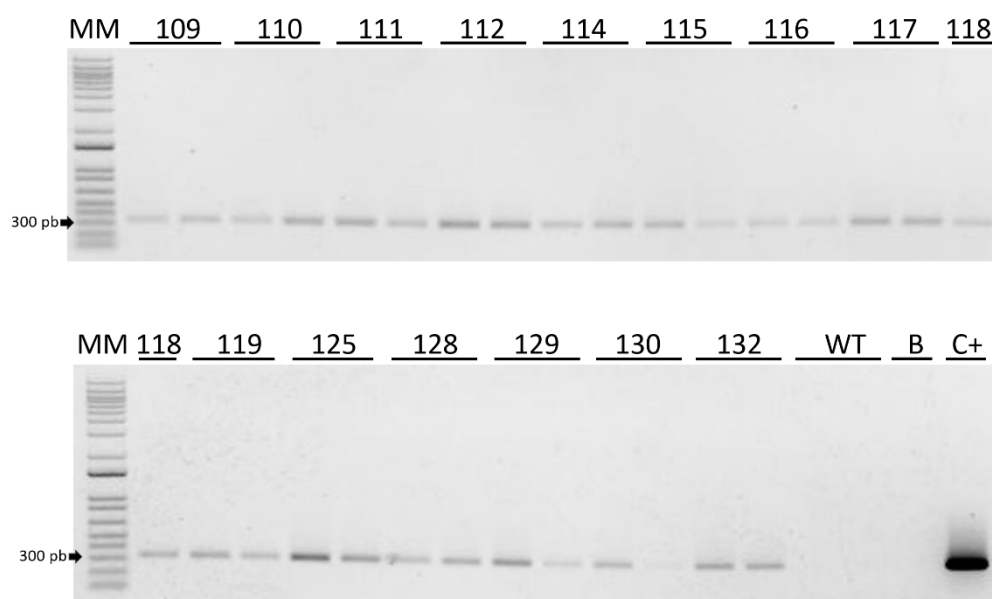


Figura suplementar 5: Géis de agarose (0,8%) evidenciando os resultados da PCR realizada para a avaliação das plantas MET-hp. Iniciadores para amplificação de um fragmento de 323 pb do gene *MET*-hp foram utilizados. MM: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). Números anotados na parte superior dos géis indicam a identificação de cada linhagem transgênica. Cada planta foi analisada em duplicata. WT: arabisopsis selvagem (controle negativo). B: branco da PCR. C+: plasmídeo pCAMBIA2300/MET-hp.

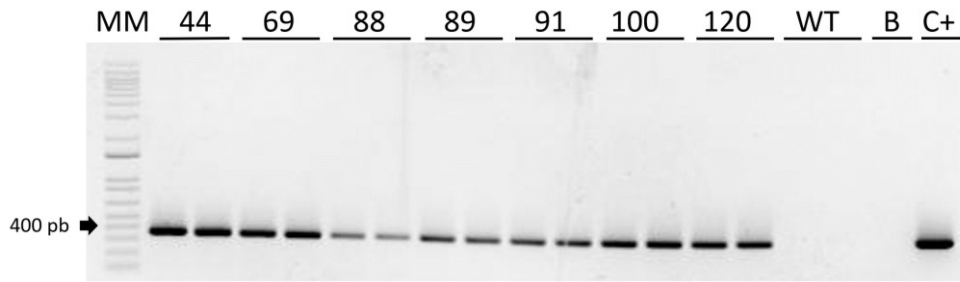


Figura suplementar 6: Gel de agarose (0,8%) evidenciando os resultados da PCR das plantas p15-hp com os iniciadores para amplificação de um fragmento do gene *p15-hp* de 370 pb. MM: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). Números anotados na parte superior do gel indicam a identificação de cada linhagem transgênica. Cada planta foi analisada em duplicata. WT: *arabidopsis* selvagem (controle negativo). B: branco da PCR. C+: plasmídeo pCAMBIA2300/p15-hp.

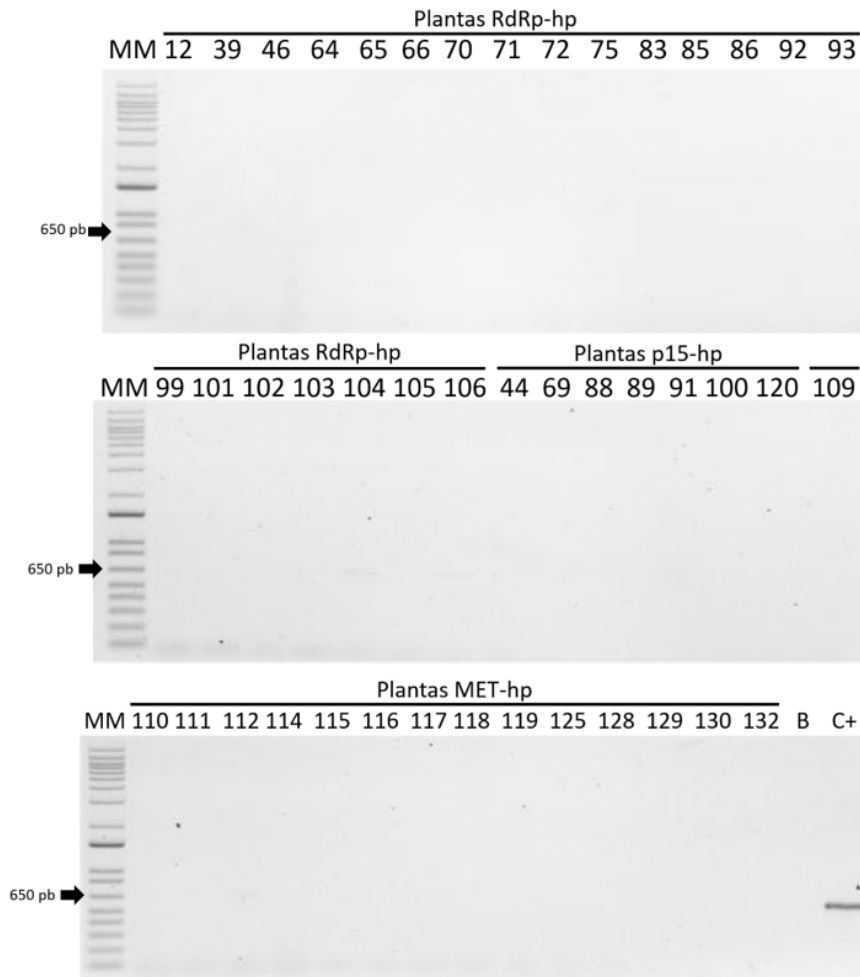


Figura suplementar 7: Gel de agarose (0,8%) demonstrando os resultados da PCR feita para análise das linhagens transgênicas com iniciadores para detecção do gene *tzs* de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, que amplifica um fragmento de 664 pb. MM: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). B: branco da PCR. C+: controle positivo (colônia isolada de *A. tumefaciens*).

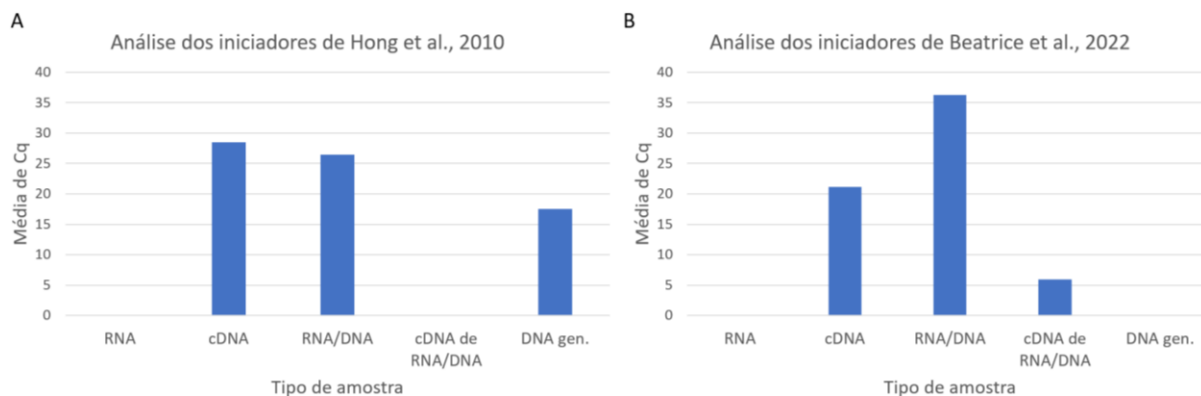


Figura suplementar 8: Análises realizadas com diferentes tipos de amostra para determinar qual par de iniciadores é o mais adequado para a amplificação do gene *SAND* com fluoróforos intercalantes para utilização como normalizador. Os dois pares de iniciadores foram desenhados em junções éxon-éxon. **A.** Análise dos iniciadores para o gene *SAND* (Hong et al., 2010). **B.** Análise dos iniciadores para o gene *SAND* (Beatrice et al., 2022).

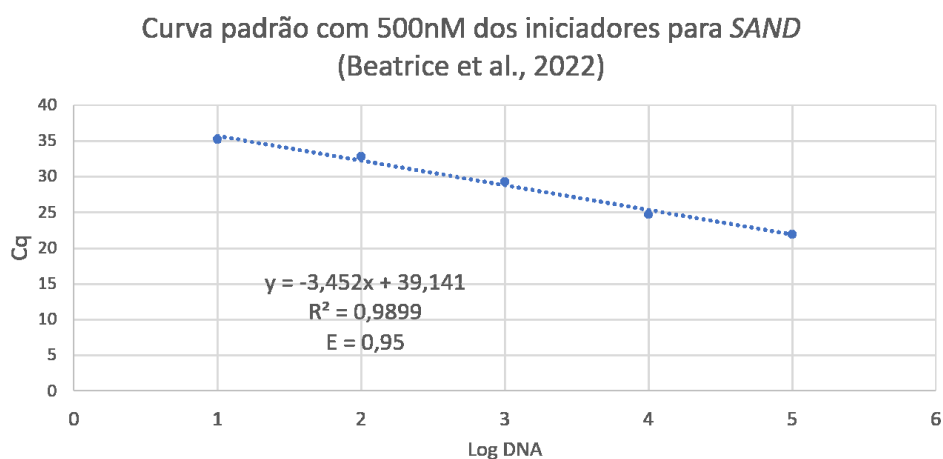


Figura suplementar 9: Curva padrão elaborada para os iniciadores para o gene *SAND* com os valores de Cq obtido com uma diluição seriada a partir de 60 ng/uL de cDNA de folhas de *Arabidopsis thaliana* sadia. Y = valor de intercessão. R^2 = coeficiente de determinação. E = eficiência de amplificação.

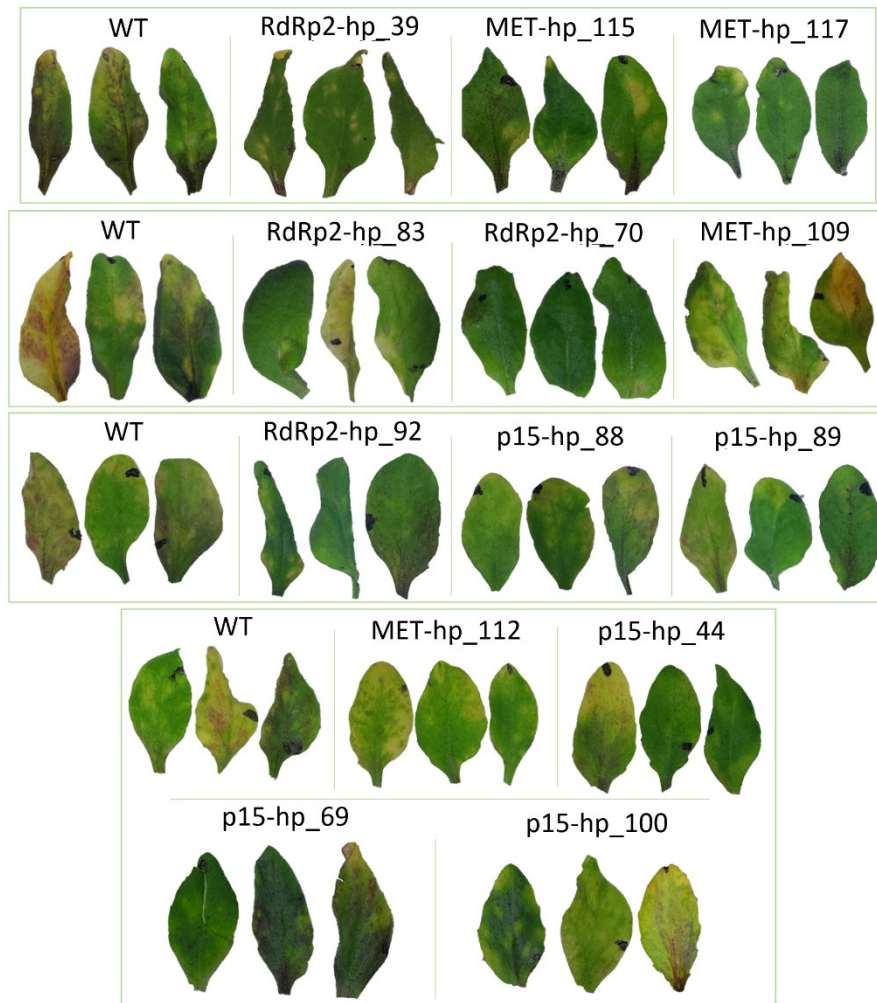


Figura suplementar 10: Sintomas nas plantas transgênicas e selvagens de cada experimento conduzido no trabalho. Apenas 3 folhas foram escolhidas para representar cada linhagem por experimento. **A.** Primeiro desafio. **B.** Segundo desafio. **C.** Terceiro desafio. **D.** Quarto desafio.