



**A POSSÍVEL GLICOPROTEÍNA DOS KITAVÍRUS E A INDUÇÃO DE
MORTE CELULAR VEGETAL**

GIOVANNE LOPES MARTINELLI

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

SÃO PAULO

2025

**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**

**A POSSÍVEL GLICOPROTEÍNA DOS KITAVÍRUS E A INDUÇÃO DE
MORTE CELULAR VEGETAL**

GIOVANNE LOPES MARTINELLI

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

SÃO PAULO

2025

GIOVANNE LOPES MARTINELLI

**A POSSÍVEL GLICOPROTEÍNA DOS KITAVÍRUS E A INDUÇÃO DE
MORTE CELULAR VEGETAL**

Dissertação apresentada para a 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

2025

Eu, Giovanne Lopes Martinelli, 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, repositório institucional ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte. Declaro também que os dados contidos nesta dissertação são inéditos e autênticos, portanto, sem fraudes e/ou derivações de plágio e que tenho pleno conhecimento do Código de Ética e dos Procedimentos referentes à proteção da integridade científica do Instituto Biológico.

Assinatura: _____ Data ____/____/____

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios Instituto Biológico Núcleo de Documentação Científica – IB

Lopes, Giovanne Martinelli

A possível glicoproteína dos kitavírus e a indução da morte celular vegetal / Giovanne Lopes Martinelli. – São Paulo, 2025. 54 p

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

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Virologia Vegetal.

Orientador: Juliana Freitas-Astúa.

Co-orientador: Pedro Luís Ramos González.

Versão do título para o inglês: The potential glycoprotein of kitaviruses and the induction of plant cell death.

1. *Cilevirus*; 2. *Kitaviridae*; 3. Proteína P61; 4. Resposta a proteínas mal dobradas; 5. Morte celular programada; 6. Estresse de retículo endoplasmático I. Lopes, Giovanne Martinelli. II. Freitas-Astúa, Juliana. III. Ramos-González, Pedro Luís. IV. Instituto Biológico (São Paulo). V. A possível glicoproteína dos kitavírus e a indução da morte celular vegetal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Giovanne Lopes Martinelli

Título: A possível glicoproteína dos kitavírus e a indução de morte celular vegetal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Sintomas causados pelos cilevírus	5
2.2 Organização genômica dos cilevírus	6
2.3 Interações Vírus-Planta	7
2.4 Estresse do retículo endoplasmático e a resposta a proteínas mal dobradas (UPR)	10
2.5 Processos celulares durante a infecção do CiLV-C e a expressão da possível glicoproteína P61	14
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Análises <i>in silico</i> de ORFs e proteínas homólogas á P61 de CiLV-C	17
4.2 Desenvolvimento de construções para a expressão transiente das proteínas P61 de CiLV-C CRD/SJP e P62 de PfGSV, SvRSV e CiLV-C2	18
4.2.1 Clonagem em pGEM T-Easy.....	18
4.2.2 Clonagem no vetor p35S_IB.....	20
4.2.3 Clonagem no vetor binário pCAMBIA 2300 e transformação em <i>Agrobacterium tumefaciens</i> linhagem AGL-1	20
4.3 Cultivo de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> e ensaios de agroinfiltração.....	22
4.4 Padronização do protocolo para extração de RNA total de folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i> , síntese de cDNA e ensaios de qPCR.....	23
4.5 Ensaio de RT-qPCR a para o gene bZIP60 de <i>Nicotiana benthamiana</i> 24 horas após a expressão transiente da proteína P61 de CiLV-C_CRD, CiLV-C_SJP e o vetor vazio (EV).....	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1 Análises <i>in silico</i> para as ORFs e proteínas homólogas a P61 de CiLV-C dos kitavírus	26
5.2 Análise <i>in silico</i> de motivos presentes nas proteínas homólogas à P61 de CiLV-C_CRD dos kitavírus	28
5.3 Confirmação das construções pCAMBIA 2300 p35S_IB contendo as ORFs <i>p61</i> de CiLV-C CRD/SJP e <i>p62</i> de PfGSV, SvRSV e CiLV-C, mediante o perfil de digestão por enzima de restrição.....	30
5.4 Validação do protocolo de extração de RNA e ensaios de qPCR em <i>N. benthamiana</i>	31
5.5 Avaliação da expressão relativa do gene <i>bZIP60</i> em <i>Nicotiana benthamiana</i> após expressão transiente da proteína P61 do CiLV-C das estirpes CRD e SJP	33
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÕES.....	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Sintomas induzidos por infecção natural de cilevírus. (A) Sintomas de infecção por CiLV-C em folha e fruto de laranja doce (*Citrus sinensis*) (Ramos-González et al., 2023). (B) Sintomas de infecção por PfGSV em folha e fruto de maracujazeiro (*Passiflora sp.*) (Ramos-González et al., 2020). (C) Sintomas de infecção por SvRSV em folha de *Solanum violifolium* (Fonte: Autoral).....5
- Figura 2** - Representação da organização genômica linear de membros do gênero *Cilevirus*. Faixas amarelas indicando posição das ORF homólogas a *p61* de CiLV-C no genoma de diferentes membros do gênero *Cilevirus*. (A) Membros do subgrupo 1. (B) Membros do subgrupo 2. (C) Membro do subgrupo 3. Adaptado de (Ramos-González et al., 2023).....7
- Figura 3** - Representação de identidade entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos das P61 homólogas à de CiLV-C_CRD. (A) Matriz de identidade de nucleotídeos para as ORF *p56/p61/p62/p65/p66/p69*. (B) Matriz de identidade para as sequências de aminoácidos das proteínas P56/P61/P62/P65/P66/P69 de kitavírus. (C) Árvore filogenética das ORFs homólogas à *p61* de CiLV-C_CRD. (D) Árvore filogenética das proteínas P61 homólogas à de CiLV-C_CRD.....28
- Figura 4** - Representações esquemáticas e análise dos plasmídeos pCAMBIA 2300 p35S_IB contendo genes virais. (A) Mapa gerado no software Vector NTI do plasmídeo pCAMBIA 2300 p35S_IB, destacando em azul claro a região de inserção do gene de interesse. A unidade transcrricional é composta pelo promotor constitutivo CaMV 35S, o fragmento translacional ω (ômega) do vírus do mosaico do tabaco (TMV), o gene viral de interesse e o terminador Tnos de *Agrobacterium tumefaciens*. (B) Simulação do padrão de digestão com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI, indicando os perfis esperados para as seguintes construções: poço 1 – vetor vazio (EV); poço 2 – *p61* de CiLV-C_CRD; poço 3 – *p61* de CiLV-C_SJP; poço 4 – *p62* de PfGSV; poço 5 – *p62* de SvRSV; poço 6 – *p62* de CiLV-C2. (C) Análise em gel de agarose a 1% dos plasmídeos digeridos com BamHI e EcoRI, utilizando marcador de peso molecular (MM) de 1 kb (Invitrogen).....31
- Figura 5** - Comparação dos valores médios de Cq obtidos no ensaio de RT-qPCR para o gene actina com diferentes concentrações de iniciadores (A) e entre diferentes tratamentos de RNA (B). (A) Gráfico de barras representando os valores médios de Cq ($\pm$ erro padrão) obtidos para os iniciadores nas concentrações de 400 nM (barra rosa claro) e 600 nM (barra azul claro). A linha com dois asteriscos (**), posicionada entre as barras, indica diferença estatística significativa entre as concentrações segundo o teste t de Student ($p = 0,0012$; $p < 0,01$). (B) Gráfico de barras representando os valores médios de Cq ($\pm$ erro padrão) para os seis tratamentos de RNA (T1 a T6), nas concentrações de 400 nM (rosa claro) e 600 nM (azul claro). O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado separadamente para cada concentração, não revelando diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p = 0,0974$ para 400 nM; $p = 0,0862$ para 600 nM).....32
- Figura 6** - Gráficos de barras representando a expressão relativa do gene bZIP60 realizada por RT-qPCR 24 horas após agroinfiltração em *Nicotiana benthamiana* mediante *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 contendo o plasmídeo pCAMBIA 2300 p35S_IB para a expressão transiente da proteína P61 estirpes de CiLV-C SJP, CRD e controle (EV). Os valores representam média $\pm$ desvio padrão ($n = 10$). Resultados normalizados pelo gene actina e analisados pelo método $\Delta\Delta Cq$ ajustado por eficiência pelo método PFAFFL. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos ($p < 0,05$; ANOVA seguida de teste Tukey HSD). (*) representando ($p < 0,05$). (**) representando ($p < 0,001$).....34
- Figura 7** – Sintomatologia de morte celular em folhas de *Nicotiana benthamiana* WT, cinco dias após agroinfiltração na porção superior esquerda das folhas com *Agrobacterium tumefaciens* linhagem AGL-1 portando construções pCAMBIA2300-p35S_IB para expressão transiente da proteína P61 de CiLV-C (estirpes CRD e SJP) e vetor vazio (EV, controle negativo).....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Números de acesso para as respectivas ORFs e proteínas homólogas a P61 de CiLV-C dos kitavírus.....	18
Tabela 2 - Lista de iniciadores para a amplificação das ORFs <i>p61</i> de CiLV-C (CRD e SJP) e <i>p62</i> de PfGSV, SvRSV e CiLV-C2.....	19
Tabela 3 - Sequência dos iniciadores para o gene <i>actina</i> e <i>bZIP60</i>	26
Tabela 4 - Conjunto de predições in silico realizadas pelos softwares SignalP 6.0 para determinar a presença de peptídeo sinal (PS), DeepLoc 2.1 para a localização subcelular no RE , NetGlyc 1.0 para determinar a quantidade de sítios de N-glicosilação (N-glyc) e TMHMM 2.0 para avaliar a quantidade de domínios transmembrana (DTs).....	27
Tabela 5 - Motivos identificados pelo software MotifFinder para as proteínas possíveis glicoproteínas dos kitavírus.....	30

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado (março 2023 – março 2025).

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

Aos meus orientadores, Juliana e Pedro, pela valiosa contribuição e dedicação que tornaram este projeto possível.

Aos meus colegas do Instituto Biológico, pelo apoio técnico e emocional ao longo desta jornada.

À minha família e aos amigos, por todo o apoio e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

MARTINELLI, Giovanne Lopes. **A possível glicoproteína dos kitavírus e a indução de morte celular vegetal**. 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, 2025.

A leprose dos citros (LC) é uma das principais doenças virais que acometem a citricultura brasileira, com prejuízos recorrentes atribuídos ao citrus leprosis virus C (CiLV-C, *Cilevirus leprosis*), membro do gênero *Cilevirus*, família *Kitaviridae*. Dentre suas linhagens, a estirpe CRD é a mais estudada, servindo como referência para análises funcionais e moleculares. A proteína P61, codificada pela ORF p61 em seu RNA2, é uma possível glicoproteína com funções compatíveis a de uma efetora viral. Sua expressão transiente em *Nicotiana benthamiana* induz: a) sintomas similares aos de resposta de hipersensibilidade (HR-like), b) estresse do retículo endoplasmático (RE) e c) ativação de resposta a proteínas mal dobradas (UPR), resultando em morte celular programada (PCD), efeitos semelhantes aos observados durante a infecção por CiLV-C. Neste trabalho, análises *in silico* avaliaram características estruturais de proteínas homólogas à P61 de CiLV-C_CRD codificadas por diferentes kitavírus. Análises bioinformáticas de 13 proteínas homólogas revelaram baixa identidade de sequência entre as proteínas analisadas, mas conservação de características estruturais, como a presença de peptídeo sinal, domínios transmembrana, sítios de N-glicosilação e localização subcelular no RE. Motivos funcionais conservados e modificações pós-traducionais também foram detectados. As variantes da ORF *p61* de CiLV-C das estirpes CRD e SJP foram clonadas no vetor binário pCAMBIA 2300 contendo o promotor CaMV 35S e sequência ômega do vírus do mosaico do fumo (tobacco mosaic virus, TMV). A expressão transiente em *N. benthamiana* revelou que a P61 da estirpe SJP induz sintomas HR-like mais intensos e promove mais precocemente a expressão relativa do gene *bZIP60*, marcador da via UPR, quando comparada à estirpe CRD. Os resultados demonstram que, apesar da diversidade genômica, as proteínas homólogas à P61 de CiLV-C_CRD compartilham características estruturais conservadas e potencial função ligada à patogênese. Esses achados contribuem para o avanço no entendimento dos mecanismos moleculares da infecção por kitavírus, além de oferecerem subsídios para a identificação de alvos virais conservados passíveis de exploração em estratégias de controle.

Palavras-chave: *Kitaviridae*; proteína P61; resposta a proteínas mal dobradas (UPR); estresse do retículo endoplasmático; interação planta-vírus; glicoproteínas; expressão transiente; *Nicotiana benthamiana*; bZIP60.

ABSTRACT

MARTINELLI, Giovanne Lopes . **The potential glycoprotein of kitaviruses and the induction of plant cell death.** Dissertation (Master's 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, 2025.

Citrus leprosis (LC) is one of the most important viral diseases affecting Brazilian citrus production, with recurrent losses attributed to citrus leprosis virus C (CiLV-C, *Cilevirus leprosis*), a member of the genus *Cilevirus* within the family *Kitaviridae*. Among its lineages, the CRD strain is the most studied, serving as a reference for functional and molecular analyses. The P61 protein, encoded by the *p61* ORF on RNA2, is a putative glycoprotein with possible functions compatible with those of a viral effector. Its transient expression in *Nicotiana benthamiana* induces : a) hypersensitive response (HR)-like symptoms, b) endoplasmic reticulum (ER) stress, and c) activation of the unfolded protein response (UPR), resulting in programmed cell death (PCD), effects that are also observed during CiLV-C infection. In this study, we performed *in silico* analyses to evaluate structural features of proteins homologous to CiLV-C_CRD P61, encoded by different kitaviruses. Bioinformatic analyses of 13 homologous proteins revealed low sequence identity among them, but conserved structural features, such as the presence of signal peptides, transmembrane domains, N-glycosylation sites, and predicted ER localization. Conserved functional motifs and post-translational modification signals were also detected. The *p61* ORFs from CiLV-C CRD and SJP strains were cloned into the binary vector pCambia 2300, containing the CaMV 35S promoter and the tobacco mosaic virus (TMV) omega sequence. Transient expression in *N. benthamiana* revealed that the P61 protein from the SJP strain induces more intense HR-like symptoms and promotes earlier upregulation of the *bZIP60* gene , a marker of the UPR pathway, compared to the CRD strain. These results demonstrate that, despite genomic variability, proteins homologous to CiLV-C_CRD P61 share conserved structural features and potential roles in viral pathogenesis. These findings contribute to the advancement of our understanding of the molecular mechanisms underlying kitavirus infections and may support the identification of conserved viral targets for future control strategies.

Keywords: *Kitaviridae*; P61 protein; unfolded protein response (UPR); endoplasmic reticulum stress; plant–virus interactions; glycoproteins; transient expression; *Nicotiana benthamiana*; bZIP

1. INTRODUÇÃO

O citrus leprosis virus C (CiLV-C, *Cilevirus leprosis*), pertencente à família *Kitaviridae*, é o principal agente causal da leprose dos citros, uma doença de etiologia viral que gera impactos econômico para citricultura brasileira. A leprose é uma doença multietiológica que pode ser causada por vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* (VTBs) de pelo menos seis espécies distintas (Ramos-González et al. 2023). O CiLV-C é o membro mais estudado da família e ao infectar plantas de laranja doce (*Citrus x sinensis* (L.) Osbeck) causa sintomas caracterizados por lesões cloróticas e/ou necróticas localizadas ao redor das regiões de alimentação dos ácaros vetores, semelhantes a lesões decorrentes de resposta do tipo hipersensibilidade (*hypersensitive response* – HR) (Figura 1A) (Ramos-González et al. 2023, Arena et al. 2020). O Brasil se destaca como maior produtor mundial de laranja e suco de laranja, sendo a região do cinturão citrícola de São Paulo e sudoeste de Minas Gerais a principal área nacional de cultivo. Na safra de 2024/2025, 230,87 milhões de caixas de 40,8 Kg de laranja foram produzidas, o que representa 32% da produção mundial de laranjas frescas e 75% do suco concentrado (Fundecitrus, 2025). Anualmente, o setor arca com os prejuízos estimados de aproximadamente US\$ 100 milhões por ano devido à prevalência da leprose causada pelo CiLV-C no campo. Esses gastos se devem principalmente ao uso de acaricidas para o manejo dos ácaros vetores, à queda prematura de frutos e à diminuição da vida útil das plantas infectadas (Bassanezi 2017, Moreira 2023).

A população do CiLV-C é composta por três linhagens, sendo a linhagem CRD (originalmente caracterizada em Cordeirópolis, SP), a com maior disponibilidade de informações experimentais e moleculares entre os kitavírus (Ramos-González et al. 2016). Essa linhagem é amplamente distribuída em pomares comerciais e não comerciais de citros nas Américas. A linhagem SJP (encontrada a 1ª vez em São José do Rio Preto, SP) é prevalente e endêmica ao cinturão citrícola de São Paulo e sudoeste de Minas Gerais (Ramos-González et al. 2016, Chabi-Jesus et al. 2021). Infecções mistas envolvendo ambas as linhagens foram detectadas em folhas e frutos de laranjeiras-doce dessa região, destacando-se diferenças em sua dinâmica viral (Ramos-González et al. 2023). Embora compartilhem 85% de identidade nucleotídica, estudos indicam que a linhagem SJP possui maior capacidade de acúmulo viral, atingindo níveis pelo menos três vezes superiores aos observados na linhagem CRD (Potsclam 2022, Ramos-González et al. 2023). Uma terceira linhagem denominada ASU (Assunção) foi detectada a partir de uma amostra herborizada coletada em 1937 na cidade de Assunção no Paraguai, e não tem sido identificada no campo (Chabi-Jesus et al. 2021).

Os vírus da família *Kitaviridae* possuem genomas de RNA de fita simples de sentido positivo [+ssRNA], que no caso dos membros do gênero *Cilevirus* encontram-se divididos em dois segmentos (Locali-Fabris et al. 2006, Ramos-González et al. 2023). No RNA2, os cilevírus possuem a ORF (*Open Reading frame*) *p61* que codifica para uma possível glicoproteína de 61 kDa (P61) (Figura 2A) com características estruturais conservadas de peptídeo sinal (PS), sítios de N-glicosilação (N-glyc) e domínios transmembrana (DT) (Ramos-González et al. 2023, Arena et al. 2020). Foi demonstrado que quando expressa de forma transiente em folhas de *Nicotiana benthamiana*, a proteína P61 de CiLV-C_CRD se acumula nas membranas do retículo endoplasmático (RE) e induz morte celular do tecido. Sua localização subcelular promove a remodelação da arquitetura do RE, a formação de vesículas, estresse da organela e morte celular, o que resulta em lesões semelhantes a uma reação de hipersensibilidade (*HR-like*) observadas em infecções naturais ou experimentais por CiLV-C (Arena et al., 2016, 2020, 2016; Leastro et al., 2018). Além da reorganização do RE, uma complexa resposta de defesa celular é desencadeada, ativando múltiplas vias de defesa relacionadas à sinalização por ácido salicílico (AS), produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS), estresse do retículo endoplasmático (RE), resposta a proteínas mal dobradas (*unfolded protein response* - UPR) e morte celular programada (*programmed cell death* – PCD). Essa reprogramação transcricional é semelhante à relatada em estudos de infecções experimentais em plantas de *Arabidopsis thaliana* realizada com ácaros vetores contendo o CiLV-C_SJP (ARENA et al., 2013, 2016, 2020).

No gênero *Cilevirus*, os membros são classificados em três subgrupos filogenéticos com base na similaridade genômica de suas RNA polimerases dependentes de RNA (*RdRp*) e todos os membros possuem ORFs que codificam proteínas homólogas à P61 de CiLV-C (Ramos-González et al. 2023). A expressão da proteína P61 do CiLV-C_CRD está associada ao estresse do RE, causando a intensificação da UPR e ativação de genes envolvidos com a PCD, o que sugere relação com o fenótipo de morte celular observado durante infecções pelo vírus, possivelmente derivada de interações moleculares movidas pela P61 (Arena et al., 2020, 2016; Ramos-González et al., 2023). No entanto, observa-se que a severidade e a manifestação dos sintomas variam para cada membro do gênero, refletindo possíveis propriedades funcionais particulares entre as proteínas homóloga à P61. Por exemplo, o passion fruit green spot virus (PfGSV, *Cilevirus passiflorae*), pertencente ao primeiro subgrupo no qual também se encontram CiLV-C e CiLV-C2 (CiLV-C2, *Cilevirus colombiense*), causa sintomas que raramente se tornam necróticos nas folhas de maracujazeiro. A pinta verde do maracujazeiro é caracterizada pelo

aparecimento de manchas cloróticas distribuídas irregularmente ao longo das nervuras das folhas e manchas anelares cloróticas semelhantes a “ilhas verdes” nos frutos, que raramente se tornam necróticas (Ramos-González et al. 2020). Já o CiLV-C2 causa lesões cloróticas e necróticas semelhantes às aquelas causadas pelo CiLV-C (Roy. A, et al. 2013, Ramos-González et al. 2023). O *solanum violifolium* ring spot virus (SvRSV, *Cilevirus solani*) pertence ao segundo subgrupo e sua infecção causa lesões anelares necróticas em folhas de *Solanum violifolium*, semelhantes às observadas na leprose dos citros causada pelo CiLV-C em plantas de laranjeira, porém seus sintomas se manifestam por anéis cloróticos que se tornam necróticos ao longo da infecção (Ramos-González et al. 2022).

Considerando essa variabilidade na manifestação dos sintomas, é essencial compreender como as respostas de defesa das plantas são ativadas na presença de vírus, em especial os mecanismos mediados por ácido salicílico (AS), que desempenham papel central na imunidade contra patógenos biotróficos (Malamy et al. 1990, An & Mou. 2011). A sinalização mediada pelo AS pode ser ativada por dois mecanismos distintos, sendo eles a imunidade desencadeada por padrões (*pattern-triggered immunity* – PTI) e a imunidade desencadeada por efetores (*effector-triggered immunity* – ETI) (Wang, W, et al. 2023, Yu et al. 2024). A PTI constitui uma resposta inicial e basal, desencadeada por meio do reconhecimento de moléculas associadas a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptors* – PRRs). A ativação da PTI induz a resistência sistêmica adquirida (*systemic acquired resistance* – SAR), podendo promover o acúmulo de ROS e de AS (Khan et al. 2022, An & Mou 2011). Embora menos frequente nessa via, níveis elevados no acúmulo de AS podem desencadear sintomas de senescência semelhantes aos observados durante a reação de hipersensibilidade (HR) (Jones, D., 2006). Em contraste, a resposta do tipo ETI é ativada pelo reconhecimento específico de efetores moleculares do patógeno por proteínas de resistência (R) do hospedeiro. A ETI é caracterizada por desencadear a HR como resposta rápida, localizada e intensa, ativando a morte celular programada (*programmed cell death* - PCD) que limita a disseminação do patógeno e sinaliza o estresse para células adjacentes (Jones, J.D.G. 2006, Mandadi & Scholthof 2013, Yu et al. 2024).

Como parasitas intracelulares obrigatórios, os vírus dispõem de ferramentas moleculares que manipulam a maquinaria celular do hospedeiro e suas vias de defesa, permitindo a expressão de proteínas que favorecem a infecção (Garcia-Ruiz 2019, Musidlak et al. 2017). O retículo endoplasmático (RE) é a organela responsável pela síntese e modificação correta de proteínas e, sob condições de estresse celular, opera a

reprogramação transcricional de diversas vias de sinalização responsáveis por restaurar a homeostase (Schwarz & Blower 2016, Liu & Howell 2016). Em infecções virais, além da manipulação dos fatores celulares, a elevada demanda de expressão de proteínas relacionadas às respostas de defesa, somada à produção de proteínas virais, ocasiona a sobrecarga das funções de enovelamento correto de proteínas e acúmulo crítico de proteínas mal dobradas no lúmen do RE (Bao & Howell 2017, Prasad & Greber 2021). O RE possui um mecanismo de controle de qualidade (*endoplasmic reticulum quality control* - ERQC) que assegura a estabilidade de suas funções canônicas e impede o acúmulo excessivo de proteínas no lúmen (Liu & Howell 2010b). Sensores moleculares residentes do lúmen e ancorados às membranas do RE detectam o acúmulo de proteínas imperfeitas e ativam a via da UPR como mecanismo adaptativo e conservado em eucariotos capaz de regular os níveis de tradução e transcrição de genes responsivos ao estresse do RE (Bao & Howell 2017, Liu et al. 2007, Manghwar & Li 2022, Srivastava et al. 2018). A via da UPR possui função basal na sustentação da homeostase do RE e manutenção celular, porém os vírus possuem proteínas que podem alterar as funções da organela, estimulando o aumento da capacidade de síntese proteica para favorecer a produção de suas proteínas, ou inibindo parte da sinalização de resposta ao estresse a fim de mascarar seus efeitos nocivos (Li et al. 2021, Peña & Harris 2011, Perera et al. 2017). No entanto, o acúmulo de proteínas mal dobradas e intensificação prolongada da UPR ativam vias relacionadas à PCD como mecanismos de proteção contra danos mais graves ao organismo (Liu & Howell 2010b, Hetz & Papa 2018, Prasad & Greber 2021).

A proteína P61 do CiLV-C_CRD é capaz de induzir morte celular, estresse do RE e ativação de vias de defesa semelhantes às relatadas na infecção pelo vírus, portanto levantamos a hipótese de que as proteínas homólogas a P61, codificadas de outros kitavírus exerçam papéis equivalentes, agindo como determinantes moleculares dos sintomas do tipo leprose dos citros. Propõe-se que a proteína P61 e suas homólogas contribuam para a patogenicidade viral por meio de mecanismos conservados de interação vírus-planta, embora com possíveis especificidades associadas a cada espécie de vírus. A identificação de estruturas e funções equivalentes à P61 do CiLV-C_CRD em outras proteínas homólogas possibilita melhor compreender as possíveis interações moleculares compartilhadas na indução dos sintomas associados à leprose. Além disso, estudos comparativos entre essas proteínas poderão revelar aspectos fundamentais sobre a evolução viral e os possíveis determinantes moleculares da interação patógeno-hospedeiro na família *Kitaviridae*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sintomas causados pelos cilevírus

No geral, os kitavírus não infectam sistemicamente seus hospedeiros naturais ou experimentais conhecidos. Em infecções por cilevírus, os sintomas observados são lesões ou manchas anelares necróticas e cloróticas ou uma combinação desses padrões, sempre restritas ao redor do local de alimentação do ácaro vetor (Ramos-González et al. 2023). Em plantas infectadas por CiLV-C ou CiLV-C2 observam-se manchas anelares cloróticas e necróticas nos ramos, folhas e frutos (Figura 1A), que em casos de infecções intensas e prolongadas, podem evoluir à morte das árvores (Freitas-Astúa et al. 2018).

Em plantas de maracujá (*Passiflora* spp.) infectadas com PfGSV, manchas cloróticas são distribuídas aleatoriamente nas folhas. Com o avanço da infecção, essas manchas, por vezes tomando forma semelhante a ilhas verdes, se mesclam a manchas irregulares ao longo das nervuras, sugerindo movimentação mais eficiente do patógeno no tecido vegetal – ainda que não ocorra sistemicidade. Nos frutos, são observadas manchas verdes anelares que podem ou não evoluir para pontos necróticos, enquanto no caule, fissuras profundas se desenvolvem e se estendem pelos ramos, levando frequentemente à morte das extremidades (Figura 1B) (Ramos-González et al. 2020).

Em infecções por SvRSV são observadas lesões semelhantes às causadas por CiLV-C. Em folhas de *Solanum violifolium* surgem áreas cloróticas regulares que frequentemente evoluem para manchas necróticas irregulares. Em folhas senescentes, surgem “ilhas verdes” rodeadas por áreas cloróticas intensas, refletindo diferentes níveis de dano tecidual (Figura 1C) (Ramos-González et al. 2022).

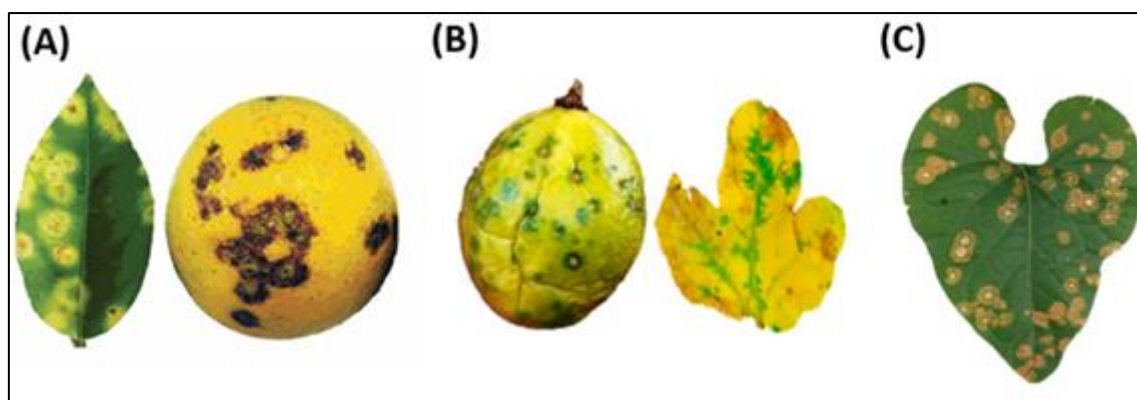


Figura 1 - Sintomas induzidos por infecção natural de cilevírus. **(A)** Sintomas de infecção por CiLV-C em folha e fruto de laranja doce (*Citrus sinensis*) (Ramos-González et al. 2023). **(B)** Sintomas de infecção por PfGSV em folha e fruto de maracujazeiro (*Passiflora* sp.) (Ramos-González et al. 2020). **(C)** Sintomas de infecção por SvRSV em folha de *Solanum violifolium* (Fonte: Autoral).

2.2 Organização genômica dos cilevírus

A família *Kitaviridae*, ordem *Martellivirales* inclui três gêneros: *Cilevirus*, *Higrevirus* e *Blunervirus*, todos com genomas segmentados de RNA de fita simples e positiva [+ssRNA]. Análises dos domínios da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) dos kitavírus revelam uma proximidade filogenética com vírus que infectam artrópodes, diferindo assim de outros vírus vegetais já conhecidos (Ramos-González et al. 2023). Essa semelhança sugere que os kitavírus possivelmente evoluíram a partir de ancestrais comuns a vírus que infectam artrópodes, como os negevírus, centivírus e afíglivírus (Kondo et al. 2020, Koonin et al. 2020, Ramos-González et al. 2022).

Os membros do gênero *Cilevirus* são os mais amplamente estudados da família *Kitaviridae*, tanto em aspectos moleculares quanto biológicos. Os cilevírus possuem genoma composto por duas moléculas de +ssRNA e são classificados em três subgrupos de acordo com a identidade de seus genomas. O primeiro subgrupo inclui CiLV-C, CiLV-C2 e PfGSV (Figura 2A). O RNA1, com tamanho variando entre 8,7 e 8,9 kb, possui a ORF *RdRp* que codifica para a RNA polimerase dependente de RNA, que contém domínios de metiltransferase, helicase e RdRP_2, e a ORF *p29*, que codifica para a proteína do capsídeo. O RNA2, com tamanho entre 4,7 e 5,0 kb, contém as ORFs *p15*, *p61*, *p32* e *p24* (Arena et al. 2020, Ramos-González et al. 2023). A ORF *p61* codifica para uma possível glicoproteína com características estruturais de PS, sítios de N-glyc e DTs na região C-terminal. A família *Kitaviridae*, ordem *Martellivirales* inclui três gêneros: *Cilevirus*, *Higrevirus* e *Blunervirus*, todos com genomas segmentados de RNA de fita simples e positiva [+ssRNA]. Análises dos domínios da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) dos kitavírus revelam uma proximidade filogenética com vírus que infectam artrópodes, diferindo assim de outros vírus vegetais já conhecidos (Ramos-González et al. 2023). Essa semelhança sugere que os kitavírus possivelmente evoluíram a partir de ancestrais comuns a vírus que infectam artrópodes, como os negevírus, centivírus e afíglivírus (Kondo et al. 2020, Koonin et al. 2020, Ramos-González et al. 2022).

Os membros do gênero *Cilevirus* são os mais amplamente estudados da família *Kitaviridae*, tanto em aspectos moleculares quanto biológicos. Os cilevírus possuem genoma composto por duas moléculas de +ssRNA e são classificados em três subgrupos de acordo com a identidade de seus genomas. O primeiro subgrupo inclui CiLV-C, CiLV-C2 e PfGSV (Figura 2A). O RNA1, com tamanho variando entre 8,7 e 8,9 kb, possui a ORF *RdRp* que codifica para a RNA polimerase dependente de RNA, que contém domínios de metiltransferase, helicase e RdRP_2, e a ORF *p29*, que codifica para a proteína do capsídeo. O RNA2, com tamanho entre 4,7 e 5,0 kb, contém as ORFs *p15*, *p61*, *p32* e *p24* (Arena et al. 2020, Ramos-González et al. 2023). A ORF *p61* codifica

para uma possível glicoproteína com características estruturais de PS, sítios de N-glyc e DTs na região C-terminal (Ramos-González et al. 2023)

O segundo subgrupo é formado pelos membros SvRSV, ligustrum leprosis virus (LigLV, *Cilevirus australis*), ligustrum chlorotic spot virus (LigCSV, *Cilevirus ligustri*) e pistachio virus Y (PisV-Y, *Cilevirus pistaciae*) (Figura 2B). Esses vírus possuem a estrutura genômica semelhantes aos do primeiro subgrupo, porém seu RNA2 é menor, com tamanhos de aproximadamente 3,6 kb. Suas ORFs homólogas a *p61* de CiLV-C são denominadas como *p62* para SvRSV e LigLV, *p61* para LigCSV e *p69* para PisV-Y (Mohammadi et al. 2021, Ramos-González et al. 2022)

O terceiro subgrupo inclui o hibiscus yellow blotch virus (HYBV, *Cilevirus oahuense*), encontrado apenas no Havai, EUA (Figura 2C). Seu RNA1 possui 8,4 kb, sendo o menor entre os cilevírus. Sua organização genômica apresenta semelhanças com o higrevírus hibiscus green spot virus 2 (HGSV2, *Higrevirus waimanalo*), que possui a ORF *p65* em seu RNA3. O RNA1 do HYBV contém as ORFs que codificam para a RdRp e a ORF *p10* parcialmente sobreposta. Seu RNA2 possui as ORFs *p29*, *p24*, e a ORF *p56* homóloga a *p61* de CiLV-C (Olmedo-Velarde et al. 2021, Ramos-González et al. 2022).

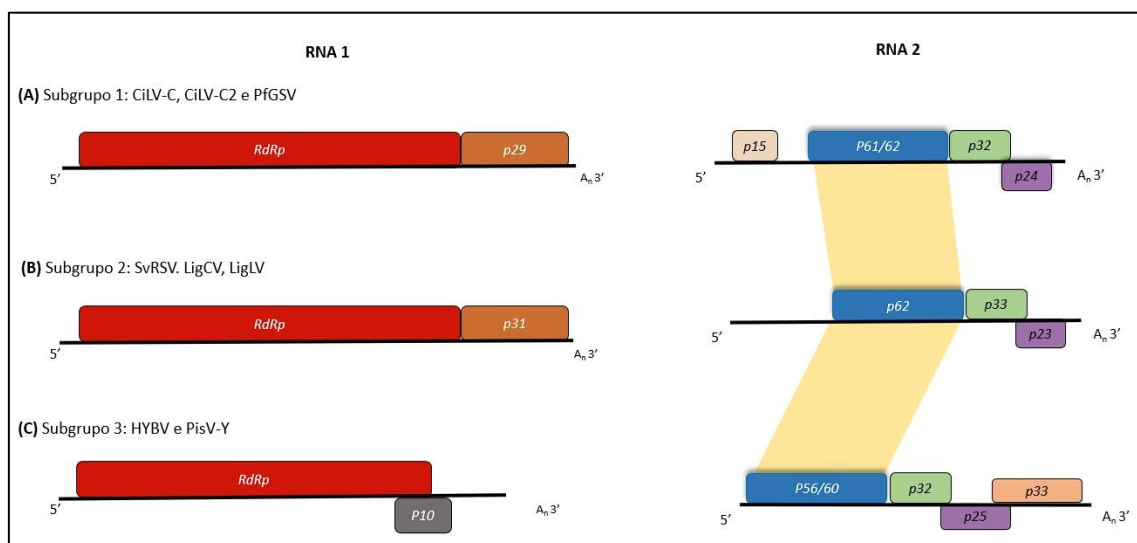


Figura 2 - Representação da organização genômica linear de membros do gênero Cilevirus. Faixas amarelas indicando posição das ORF homólogas a *p61* de CiLV-C no genoma de diferentes membros do gênero Cilevirus. **(A)** Membros do subgrupo 1. **(B)** Membros do subgrupo 2. **(C)** Membro do subgrupo 3. Adaptado de (Ramos-González et al. 2023).

2.3 Interações Vírus-Planta

Os vírus dependem da maquinaria celular do hospedeiro para completar seu ciclo de vida, utilizando estratégias que manipulam fatores celulares para favorecer a infecção, como a superexpressão ou repressão de genes específicos, além da realocação de

componentes celulares para locais estratégicos (Pollari et al. 2020, Rodriguez-Peña et al. 2021). Essas ações favorecem a replicação viral, o movimento entre células e permitem aos vírus evadirem das defesas das plantas hospedeiras (Mandadi & Scholthof 2013). As plantas, por sua vez, ativam diversos mecanismos de defesa para limitar as infecções, incluindo a resposta de hipersensibilidade (*hypersensitive response* - HR), autofagia, morte celular programada (*programmed cell death* - PCD) e o silenciamento gênico (Garcia-Ruiz, 2019; Li et al, 2019; Gomaa et al., 2024). A ativação dessas defesas é regulada principalmente por fitohormônios, cujas vias são ativadas de acordo com o tipo de agressão sofrida (Alazem & Lin 2015, Garcia-Ruiz 2019). O ácido salicílico (AS) destaca-se entre esses hormônios por estar associado à resposta contra patógenos biotróficos, incluindo vírus, e por atuar de forma antagonica ao ácido jasmônico (JA), mais relacionado à defesa contra herbivoria (An & Mou 2011, Malamy et al. 1990).

Inicialmente, o reconhecimento de fatores como os padrões moleculares associados ao patógeno (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* – PAMPs) estimula a imunidade desencadeada por padrão (*pattern-triggered immunity* - PTI), uma resposta basal que raramente leva a uma reação do tipo HR (*HR-like*), mas ativa a resistência sistêmica adquirida (*- systemic acquired resistance* - SAR), preparando a planta para subseqüentes respostas defensivas mais robustas (Yu et al. 2024). Já a imunidade induzida por efetores (*Effector-Triggered Immunity* - ETI) ocorre quando moléculas específicas dos patógenos são reconhecidas por proteínas R do hospedeiro, ativando uma resposta intensa que frequentemente culmina em HR e morte celular localizada para conter a disseminação viral (Musidlak; Nawrot; Goździcka-Józefiak, 2017; Yu et al., 2024). A severidade da doença, portanto, dependerá do equilíbrio entre a eficácia das defesas vegetais e a capacidade do vírus em suprimir ou evadir essas respostas. Além disso, a ausência ou mutações em genes de suscetibilidade (genes provirais) podem reduzir ou impedir a colonização viral, conferindo resistência ou tolerância (Lellis et al., 2002).

As vias mediadas por AS podem ser ativadas tanto pela PTI quanto pela ETI, entretanto, enquanto a PTI raramente resulta em uma resposta do tipo HR, a ETI frequentemente culmina nessa resposta (Yu et al. 2024, Jones, J.D.G. 2006, An & Mou 2011). A ativação da via do AS também influencia diretamente o equilíbrio das espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS), cujo acúmulo excessivo pode intensificar a HR, causando a morte celular localizada e limitando fisicamente a propagação do patógeno (Xia et al. 2015). Além de seu papel canônico no desenvolvimento vegetal, o AS também influencia o metabolismo da glutatona (GSH), essencial para o equilíbrio redox celular e a proteção contra danos oxidativos. As células

vegetais mantêm os níveis de ROS sob controle por meio de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, entre os quais a glutathiona reduzida (GSH) se destaca (Noctor et al. 2012, Hasanuzzaman et al. 2019, Saleem et al. 2021). Embora o AS frequentemente induza um aumento inicial na produção de ROS, ele também estimula a síntese de GSH, a forma antioxidante ativa que neutraliza ROS e protege contra danos celulares (Tari et al. 2015, Kaya et al. 2020). O aumento da concentração de GSH também resulta no aumento da expressão de genes defensivos dependentes da proteína NPR1 (*nonexpressor of pathogenesis-related genes 1*), como relatado em plantas de tabaco (Ghanta et al. 2011, Saleem et al. 2021). As respostas imunes também podem sobrecarregar as organelas celulares, particularmente o retículo endoplasmático (RE), desencadeando a via UPR (*unfolded protein response*), como uma resposta adaptativa que visa restaurar a homeostase celular (Howell 2017, Prasad & Greber 2021, Poór et al. 2019). Entretanto, caso o estresse seja prolongado, a UPR pode induzir a ativação da PCD como último recurso (Adhikari et al. 2025, Li et al. 2018).

O RE e suas proteínas são frequentemente alvos de manipulação pelos vírus, que frequentemente formam suas vesículas de replicação em estruturas membranosas associadas ao RE (Heinlein, 2015; Hyodo; Kaido; Okuno, 2014; Rodriguez-Peña; Mounadi; Garcia-Ruiz, 2021; Verchot, 2011). Um exemplo dessa interação ocorre em infecções por tobacco mosaic virus (TMV, *Tobamovirus tabaci*), em que o RE é reorganizado para formar agregados irregulares na membrana, contendo proteínas de replicação, RNA genômico viral e chaperonas residentes do RE. Esses componentes colaboram na montagem e funcionalidade do complexo de replicação viral (Heinlein, 2015; Verchot, 2011). O TMV também modifica as cisternas do RE para gerar vesículas móveis compostas das membranas da organela, que são direcionadas aos endossomos e promovem a disseminação do vírus às células adjacentes (Solovyev et al., 2022). De forma semelhante, o turnip mosaic virus (TuMV, *Potyvirus rapae*) é capaz de remodelar múltiplas organelas, unindo o cloroplasto, o aparelho de Golgi e o RE em uma estrutura globular periférica ao núcleo, formando seu complexo de replicação (Gomaa et al., 2024; Grangeon et al., 2012). Esses mecanismos demonstram a habilidade dos vírus em reorganizar diversos compartimentos intracelulares do hospedeiro para criar um ambiente favorável à sua multiplicação

A modulação da UPR é outra estratégia amplamente utilizada por vírus que infectam tanto mamíferos quanto plantas. Entre as vias da UPR comumente manipuladas por vírus de RNA, destaca-se a via mediada por IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*) e o fator de transcrição bZIP60 (*basic leucine zipper*), amplamente associada à mitigação do

estresse do retículo RE durante a infecção viral (Heinlein, 2015; Zhang et al., 2015). Em vírus de animais como o da dengue (DENV, *Orthoflavivirus denguei*), cuja replicação depende da maquinaria do RE para a síntese proteica, a ativação da via IRE1-XBP1, homóloga à IRE1-bZIP60 em plantas, é fundamental para facilitar a infecção. O estresse no RE compromete funções pós-traducionais, acionando a UPR como mecanismo compensatório, o que resulta em aumento da capacidade funcional do RE, favorecendo a replicação viral (Peña; Harris, 2011; Yu et al., 2006). De forma análoga, fitovírus como potexvírus e potyvírus também induzem a via IRE1-bZIP60, promovendo a expressão de chaperonas e ampliando a capacidade do RE de acomodar o acúmulo de proteínas virais e do hospedeiro necessárias à replicação (Gayral et al., 2020; Herath et al., 2020). Nesse contexto, ocorre uma relação intrínseca entre o acúmulo de proteínas virais no RE, a resposta de UPR e a PCD. Por exemplo, a expressão transiente da proteína P25 de potato virus X (PVX, *Potexvirus ecspotati*) em *Nicotiana benthamiana* provoca estresse no RE, resultando em um acúmulo excessivo de proteínas, que em níveis elevados acarreta PCD como mecanismo para conter o estresse causado e limitar a disseminação de patógenos (Yang et al., 2020).

Outras proteínas virais como a TGB3 dos potexvírus, que participa da movimentação viral e reorganização do RE, e a 6K2 dos potyvírus, essencial para formação das vesículas de replicação, transporte viral e interação com o RE, aumentam a expressão dos fatores de transcrição bZIP17, bZIP28 e bZIP60 em *N. benthamiana* e *Arabidopsis thaliana* (Spetz; Valkonen, 2004; Ye et al., 2013). Evidências adicionais apontam que a ativação da via IRE1A-bZIP60 limita a infecção por Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV, *Potexvirus marmorplantagonis*), enquanto as isoformas IRE1A e IRE1B são capazes de restringir infecções por TuMV em *A. thaliana*. Ainda, a superexpressão de chaperonas do RE, como as BiPs, em *N. benthamiana* foi associada à redução de sintomas de necrose e estresse oxidativo induzidos pela proteína TGB3, reforçando o papel da UPR como mecanismo protetor frente à infecção viral (Gayral et al., 2020). Esses elementos destacam o envolvimento da UPR na replicação e disseminação viral.

2.4 Estresse do retículo endoplasmático e a resposta a proteínas mal dobradas (UPR)

O RE compõe cerca de 50% das membranas celulares, sendo formado por uma rede de túbulos e cisternas interconectados onde ocorre o dobramento de proteínas recém-sintetizadas. No lúmen do RE, chaperonas moleculares realizam modificações pós-traducionais, como a formação de pontes dissulfeto, N-glicosilação e fosforilação,

garantindo a funcionalidade das proteínas antes de seu direcionamento para a rota secretora (Benham, 2019; Westrate et al., 2015). O dobramento e a maturação de proteínas no RE constituem processos essenciais e complexos, que são mediados por chaperonas que integram o controle de qualidade do retículo endoplasmático (*endoplasmic reticulum quality control* - ERQC) e atuam na construção e proteção das proteínas recém-sintetizadas (Liu; Howell, 2010a; Strasser, 2018).

As proteínas BiP (*binding immunoglobulin protein*), chaperonas da família das proteínas de choque térmico (*heat shock protein* - HSP), são fundamentais nesse contexto. As BiPs contêm um domínio de ligação de nucleotídeos (*nucleotide binding domain* - NBD) responsável pela ligação e hidrólise do ATP, além de um domínio de ligação ao substrato (*substrate binding domain* - SBD) interagindo com as proteínas para auxiliar no seu dobramento e evitar acúmulo de formas mal dobradas (Alfaro-Valdés et al., 2018). Ao iniciar a síntese de proteínas direcionadas à rota secretora do RE, as BiPs que atuam no lúmen auxiliam na regulação da eficiência do dobramento dos peptídeos, garantindo sua conformação correta. No lúmen do RE, elas podem ser ativadas na presença de estresses abióticos, como seca e frio ou por infecções por patógenos como os vírus (Herath et al., 2020; Pincus et al., 2010). Quando há o dobramento incorreto de uma proteína e a mesma não pode ser redobrada, as BiPs direcionam as proteínas defeituosas para o sistema de degradação associado ao retículo endoplasmático (*ER-associated degradation* - ERAD), evitando o acúmulo perigoso que comprometeria a função celular (Pincus et al., 2010; Vitale et al., 2019). Fatores abióticos e bióticos aumentam a demanda por proteínas, podendo exceder a capacidade do RE de regular acúmulo de proteínas defeituosas, causando estresse no RE (Liu; Howell, 2016; Manghwar; Li, 2022; Schwarz; Blower, 2016). A resposta à quebra da homeostase ativa a UPR que busca restaurar o equilíbrio celular. Caso o estresse persista, mecanismos como PCD ou autofagia são ativados (Howell, 2013; Liu et al., 2015; Schröder; Kaufman, 2005). Em plantas, além de fatores ambientais e bióticos, agentes químicos como ditiotreitol (DTT) e tunicamicina (Tm) também podem causar o estresse do RE e induzir a UPR (Bao; Howell, 2017; Pastor-Cantizano et al., 2020).

A UPR é capaz de regular a expressão dos próprios genes do ERQC, incluindo BiPs, calnexina, calreticulina e PDI (*protein disulfide isomerase*), prevenindo o acúmulo de proteínas defeituosas, assegurando a conformação adequada das proteínas recém-sintetizadas, e garantindo sua funcionalidade e estabilidade (Liu; Howell, 2010a). Em condições normais, a UPR desempenha papéis fundamentais além da manutenção celular, como o desenvolvimento reprodutivo e crescimento das raízes ao influenciar a biologia

hormonal e fisiológica da planta(Liu; Howell, 2010a; Manghwar; Li, 2022). Sob estresse, sensores moleculares no lumém RE detectam proteínas defeituosas, ativando uma cascata de sinalização para reduzir a síntese proteica, aumentar a capacidade de dobramento e induzir mecanismos de degradação de proteínas associadas ao RE. A alta abundância de genes relacionados à UPR em plantas sugere que essas respostas ao estresse exerçam papéis importantes além do combate a patógenos e nas adaptações às adversas condições ambientais (Bao; Howell, 2017; Park; Park, 2019).

O principal e mais conservado ramo da UPR em plantas é mediado pela via IRE1-bZIP60, onde a enzima IRE1 é o mediador primário da resposta ao estresse no RE e, em condições homeostáticas, permanece inativo com as BiPs ligadas ao seu domínio luminal (Chen; Brandizzi, 2013; Nagashima et al., 2011; Pincus et al., 2010). Com o acúmulo de proteínas mal dobradas, as BiPs se dissociam de IRE1 e se ligam às proteínas mal dobradas, permitindo a oligomerização e autofosforilação de IRE1, ativando suas funções de proteína quinase (PK) e ribonuclease (RNase) no citosol e dando início a uma cascata de transdução de sinal associada à resposta ao estresse no RE (Deng; Srivastava; Howell, 2013; Howell, 2013; Manghwar; Li, 2022). As BiPs também podem atuar como reguladoras de feedback negativo da UPR, pois sua dissociação de IRE1 promove o aumento da produção de chaperonas, incluindo as próprias BiPs. Com a diminuição de proteínas mal dobradas no lúmen do RE, as BiPs voltam a se ligar aos sensores IRE1, dissociando a dimerização e retornando à posição estacionária, que consequentemente reduz a expressão de genes relacionados à UPR (Alfaro-Valdés et al., 2018; Oikawa et al., 2009). A via IRE1 também regula a degradação de RNA dependente de IRE1 (*regulated IRE1-dependent RNA degradation* – RIDD), um processo que envolve a degradação de transcritos de RNA para ajudar a gerenciar o acúmulo de proteínas no RE, redirecionando recursos celulares que promovem a restauração da homeostase da organela (Hollien J; Weissmann JS, 2006; Orr et al., 2006; Srivastava et al., 2018). Em *A. thaliana* ocorrem as isoformas de IRE1, denominadas AtIRE1a, AtIRE1b AtIRE1c (equivalentes a IRE1 α e IRE1 β em mamíferos) que podem formar homo- ou heterodímeros que realizam o splicing não convencional do mRNA de bZIP60 presente no citosol(Deng; Srivastava; Howell, 2013; Mishiba et al., 2019; Pincus et al., 2010).

A ativação do ramo IRE1-bZIP60 é altamente específica, ocorrendo em estruturas de loops gêmeos com sequências de bases de consenso reconhecidas por IRE1. O mRNA bZIP60U (*unspliced*) codifica para uma proteína que possui um domínio transmembrana hidrofóbico em sua extremidade C-terminal, codificada na região do íntron. O splicing alternativo realizado pela forma ativa de IRE1 remove o íntron de 23 nucleotídeos,

alterando o quadro de leitura do mRNA para a formação de um produto solúvel com sinal de localização nuclear (*nuclear localization signal* - NLS) denominado bZIP60S (*spliced*), que atua como um fator de transcrição (FT) (Chen; Brandizzi, 2013; Nagashima et al., 2011). Os genes ativados pelo FT bZIP60S possuem elementos regulatórios específicos, denominados de elementos de estresse do RE (*endoplasmic reticulum stress response Element* - ERSEs) e elementos responsivos à UPR (*unfolded protein response element* - UPRES) em suas regiões promotoras (Bao et al., 2018; Deng et al., 2011; Howell, 2013). O FT bZIP60S reconhece as regiões promotoras de genes como NAC103, NAC062 e NAC089, que regulam genes relacionados à abundância de chaperonas e foldases do RE, respostas ao estresse do RE e PCD, modulando a UPR de acordo com a necessidade (Sun et al., 2013b; Yang et al., 2014a, 2014b).

Outro ramo da UPR envolve os fatores de transcrição bZIP17 e bZIP28 (Liu et al., 2007; Srivastava; Deng; Howell, 2014; Sun et al., 2013a). Em condições homeostáticas, bZIP17 e bZIP28 permanecem retidos no RE por associação com BiPs. No entanto, sob estresse, BiP é dissociado, permitindo a translocação de bZIP17 e bZIP28 para o aparelho de Golgi, mediada pelo complexo COPII (Herath et al., 2022; Nawkar et al., 2018; Srivastava; Deng; Howell, 2014). No Golgi, são ativados por meio da proteólise intramembranar regulada (*regulated intramembrane proteolysis* - RIP), que envolve as proteases S1P (protease do sítio 1) e S2P (protease do sítio 2). Essa ativação resulta na liberação do domínio transmembrana, criando um NLS e permitindo a translocação para o núcleo para sua atuação como fator de transcrição (Liu et al., 2007; Srivastava; Deng; Howell, 2014).

Os ramos da UPR regulam diferentes conjuntos de genes. Por exemplo, o bZIP28 é responsável pela regulação abrangente dos genes canônicos da UPR, enquanto o bZIP17 exerce uma função mais especializada em resposta a estresses ambientais. Análises de mutantes duplos em plantas de *A. thaliana* revelaram que os FT bZIP28 e bZIP60 atuam conjuntamente como reguladores da UPR, enquanto bZIP17 atua em subconjuntos específicos de genes, particularmente sob fatores abióticos (Liu et al., 2007; Sun et al., 2013a, 2013b). As chaperonas, como a BiP, juntamente com a ativação dos sensores IRE1, bZIP17 e bZIP28, não apenas garantem a conformação adequada das proteínas, mas também estabelecem uma rede de sinalização que responde de maneira dinâmica a estresses ambientais. Além disso, bZIP28, bZIP60 e bZIP17 podem se ligar a elementos promotores ou se combinar com FTs bZIPs, formando complexos de transcrição heterodiméricos que regulam positivamente a expressão de diferentes genes relacionados ao estresse do ER (Liu; Howell, 2010a, 2010b). Essa interconexão complexa entre as vias

da UPR reflete a necessidade de uma resposta robusta e coordenada, essencial para a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas em um ambiente em constante mudança. No entanto, falhas induzidas nas vias de sinalização podem ter consequências intensas, comprometendo não apenas a funcionalidade celular, mas também processos no crescimento, diferenciação celular e adaptações ao estresse (Bao; Bassham; Howell, 2019; Hetz; Papa, 2018; Manghwar; Li, 2022).

2.5 Processos celulares durante a infecção do CiLV-C e a expressão da possível glicoproteína P61

Infecções experimentais realizadas com ácaros *Brevipalpus yothersi* virulíferos, utilizando o vírus CiLV-C estirpe SJP em plantas de *Arabidopsis thaliana* selvagens, demonstraram que os níveis de RNA viral se mantêm estável nas primeiras 24 horas após a infecção, com aumento inicial na transcrição dos genes *RdRp* e *p29*, seguido pela elevação gradual dos genes *p15*, *p61*, *p24* e *p32* (MP) (Arena et al., 2020). Os primeiros sintomas de manchas cloróticas surgem cerca de uma semana após a infecção, evoluindo para manchas necróticas e senescência das folhas infectadas. Essas alterações são semelhantes às observadas em infecções naturais em laranjeiras doces, porém ocorrem de forma mais precoce em plantas de *A. thaliana*, resultando na morte das folhas entre 10 e 12 dias após o início da infecção (Arena et al., 2016). No estágio inicial da infecção, foram regulados positivamente 86% dos genes diferencialmente expressos (GDEs) avaliados, com o maior número de alterações observado aos 7 dias após a infestação, período coincidente com o surgimento dos sintomas iniciais nas folhas (Arena et al., 2020). Nesse ponto, 54 % dos GDEs foram regulados positivamente, destacando processos biológicos relacionados ao estresse celular e defesa biótica, ativação da biossíntese de AS, acúmulo de ROS, aumento da expressão de fatores de transcrição associados à defesa biótica. Em contrapartida, 46% foram regulados negativamente, com destaque àqueles relacionados à defesa contra herbivoria, como os da via do ácido jasmônico (JA) (Arena et al., 2020).

A infecção experimental com CiLV-C_SJP em plantas de *A. thaliana* selvagem também induziu a expressão de genes relacionados ao estresse do RE que atuam na regulação da UPR, incluindo o FT bZIP60, envolvido na mais conservada via de regulação da UPR em eucariotos (Arena et al., 2020; Ramos-González et al., 2023). Foi relatada a superexpressão de chaperonas residentes do RE, o que indica que o estresse no RE possui papel na regulação transcricional durante a infecção. Contudo, a atuação exata desses fatores no patossistema ainda não está totalmente compreendidos (Arena et al., 2016; Leastro et al., 2020; Ramos-González et al., 2023). Em plantas mutantes de *A.*

thaliana que expressavam o gene *NahG*, que codifica para a enzima salicilato hidroxilase - responsável por converter o AS em catecol, ocasionando a deficiência em vias dependentes do AS - foi relatado maior acúmulo de partículas virais e sintomas mais intensos em relação às plantas selvagens, demonstrando que a presença do AS atenua a infecção, enquanto sua ausência intensifica o acúmulo viral e os sintomas de morte celular (Arena, dados não publicados).

As funções das proteínas virais do CiLV-C foram investigadas individualmente a partir da estirpe CRD de CiLV-C, por meio da expressão transiente de todas as suas ORFs em folhas de *Nicotiana benthamiana* selvagens. Dentre as ORFs testadas, apenas a possível glicoproteína codificada pela ORF *p61* foi capaz de induzir o fenótipo de morte celular, desencadear acúmulo de ROS e ativar vias de defesa associadas ao AS, acompanhadas da redução significativa nos níveis de JA (Arena et al., 2020). Também foi relatado aumento na expressão dos genes *bZIP60*, *NAC089*, *PDI* e *BPL4*, todos associados ao estresse do RE e UPR. Além disso, ensaios de PCR convencional com iniciadores específicos para a detecção do mRNA do gene *bZIP60S*, ou seja, o mRNA de *bZIP60* que sofreu o *splicing* alternativo no citosol para codificar o FT *bZIP60*, demonstram que sua ocorrência está associada à presença da proteína P61. Em plantas de *Nicotiana benthamiana* que expressam o gene *NahG*, a expressão transiente da proteína P61 resultou em sintomas de morte celular mais intensos comparados às plantas selvagens, indicando que a expressão da proteína P61 ativa mecanismos de defesa semelhantes aos durante a infecção por CiLV-C, independente da presença do fitohormônio AS (Arena et al., 2020, Arena, dados não publicados).

As glicoproteínas são proteínas que contêm cadeias de carboidratos (glicanos) covalentemente ligadas a resíduos específicos de aminoácidos. A N-glicosilação – forma mais comum em proteínas da via secretora – ocorre pela adição de um glicano ao grupo amida da asparagina (Asn) no motivo consenso Asn-X-Ser/Thr (Helenius; Aebi, 2004; Lisowska, 2006; Roth, 2002). Em eucariotos, esse processo acontece no RE, onde o pré-glicano é transferido por uma oligosacariltransferase para a cadeia nascente (Kelleher; Gilmore, 2006; Lisowska, 2006). Após essa etapa, os glicanos são modificados no RE e no complexo de Golgi, formando estruturas maduras que influenciam o destino e a função das proteínas, participando de processos como enovelamento proteico, estabilidade, controle de qualidade, tráfego intracelular e reconhecimento molecular (Helenius; Aebi, 2004; Moremen; Tiemeyer; Nairn, 2012; Spiro, 2002). Em plantas, embora o mecanismo biossintético seja conservado, os N-glicanos maduros contêm estruturas típicas, como β 1,2-xilose e α 1,3-fucose, distintas das observadas em animais, refletindo adaptações

evolutivas específicas, mas mantendo funções essenciais (Helenius; Aeby, 2004; Lisowska, 2006; Spiro, 2002; Strasser, 2016).

Glicoproteínas virais são amplamente descritas em vírus que infectam animais, especialmente aqueles com envelope lipídico (Banerjee; Mukhopadhyay, 2016; Sanchez; Vincent; Nichol, 2002; Wahl-Jensen et al., 2005). Nessas infecções, os N-glicanos presentes em proteínas virais promovem o enovelamento adequado, facilitam a entrada do vírus na célula, modulam a resposta imune do hospedeiro e contribuem para a montagem e liberação de vírions (Banerjee; Mukhopadhyay, 2016). Em vírus de plantas, a presença de glicoproteínas é menos comum, uma vez que a maioria desses vírus não possui envelope (Banerjee; Mukhopadhyay, 2016; Zhang et al., 2021). No entanto, a identificação de proteínas virais com potenciais sítios de N-glicosilação em fitopatógenos como o CiLV-C levanta a hipótese de que essas modificações possam conferir vantagens funcionais, incluindo atuação tanto no hospedeiro vegetal quanto nos vetores artrópodes (Ramos-González et al., 2023). No caso do CiLV-C, a proteína P61 é considerada uma possível glicoproteína, com múltiplos sítios previstos de N-glicosilação. No entanto, análises funcionais e bioquímicas ainda são necessárias para confirmar a presença real de glicanos em sua estrutura e esclarecer seu papel durante a infecção.

É provável que as reações fisiológicas e moleculares ocorram devido à intensa produção de proteínas de defesa combinada ao acúmulo excessivo da P61 e a reestruturação das membranas do RE, sobrecarregando suas funções essenciais do RE e induzindo fortemente a via de UPR, que por não alcançar homeostase celular ativa a PCD como última linha de defesa adaptativa, eliminando a célula comprometida (Li et al., 2018; Arena, dados não publicados). Os sintomas de necrose observados na interação do CiLV-C_SJP com plantas de *Arabidopsis thaliana* sugerem que a proteína P61 de ambas as estirpes é uma possível efetora da patogênese viral, induzindo uma resposta de defesa robusta e culminando no fenótipo característico de HR-like (Arena et al., 2016, 2020, 2017). Adicionalmente, a expressão de um mutante de P61_CRD sem a porção N-terminal que codifica o PS não provocou sintomas nem modificações na regulação gênica, ao contrário da proteína nativa (Arena, dados não publicados). Contudo, ainda não está claro se a ativação da UPR ocorre intencionalmente para favorecer a infecção viral ou incidentalmente como consequência da produção de proteínas virais. A presença de proteínas homólogas em outros membros da família *Kitaviridae*, com características estruturais semelhantes, reforça a hipótese de que as proteínas P61 de CiLV-C_CRD e suas homólogas desempenhem funções conservadas durante a infecção, destacando sua relevância tanto no ciclo viral quanto na interação com o hospedeiro.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar características estruturais e funcionais, conservadas ou específicas, entre as proteínas homólogas à P61 de CiLV-C_CRD.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar análises *in silico* para identificar características estruturais presentes em proteínas homólogas à P61 de CiLV-C_CRD;
- Desenvolver construções genéticas para expressão transiente de proteínas homólogas a P61 de CiLV-C dos cilevírus em sistemas heterólogos mediante agroinfiltração;
- Analisar a expressão relativa do gene bZIP60, marcador associado à via do estresse do retículo endoplasmático envolvida na resposta a proteínas mal dobradas (UPR).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Análises *in silico* de ORFs e proteínas homólogas à P61 de CiLV-C

A identificação de homólogos da ORF *p61* e da proteína P61 do CiLV-C_CRD foi realizada por meio do software Blast¹ (NCBI) (Kearse et al., 2012) (Tabela 1). O alinhamento múltiplo de sequências (*multiple sequence alignment* - MSA) foi realizado com as ferramentas dos softwares MAFFT² (Katoh; Standley, 2013), as árvores filogenéticas foram criadas através do software W-IQ-TREE³ (Trifinopoulos et al., 2016) e visualizadas através do iTOL V7⁴ (Letunic; Bork, 2024). Foram realizadas predições utilizando ferramentas bioinformáticas da DTU Health Tech para a presença de peptídeo sinal (PS) através do software SignalP 6.0⁵ (Nielsen et al., 2024). Para a presença de domínios transmembranas (DTs), foi utilizado o software TMHMM 2.0⁶ (Sonnhammer; Von Heijne; Krogh, 1998), enquanto a presença de sítios N-glicosilação (N-glyc) e a predição da localização subcelular foram avaliadas através dos softwares NetNGlyc 1.0⁷ (Gupta; Brunak, 2002) e DeepLoc 2.1⁸ (Ødum et al., 2024), respectivamente. Os motivos conservados foram identificados a partir da análise utilizando o software Motif Search –

¹ Basic Local Alignment Search Tool - BLAST

² MAFFT alignment and NJ / UPGMA phylogeny - CBRC

³ IQ-TREE: Efficient phylogenomic software by maximum likelihood

⁴ iTOL: Interactive Tree Of Life

⁵ SignalP 6.0 - DTU Health Tech - Bioinformatic Services

⁶ TMHMM 2.0 - DTU Health Tech - Bioinformatic Services

⁷ NetNGlyc 1.0 - DTU Health Tech - Bioinformatic Services

⁸ DeepLoc 2.1 - DTU Health Tech - Bioinformatic Services

GenomeNet⁹ utilizando como padrão para pontuação de corte o *E-value* de 1.0 (*E-value*= número de possíveis alinhamentos × *E-value* do alinhamento observado). *E-values* < 0.1 foram considerados de alta confiabilidade, valores de *E* > 0.5 como possíveis motivos e acima de 1 foram desconsiderados (NAGARAJAN; NG; KEICH, 2008; Ryen et al., 2014).

Tabela 1 - Números de acesso para as respectivas ORFs e proteínas homólogas a P61 de CiLV-C dos kitavírus

Vírus (isolado)	Número de acesso no GenBank - NCBI	
	ORF	Proteína
CiLV-C_CRD	NC_008170.1	YP_654541.1
CiLV-C_SJP	KP336747.1	AKJ79136.1
CiLV-C_ASU	MT554546.1	QUM93150.1
CiLV-C2_COL	NC_038849.1	YP_009508074.1
CiLV-C2_HAW	KC626784.1	YP_009508074.1
PfGSV_SNP	NC_055652.1	YP_010088078.1
PfGSV_BJL	MK804176.1	QFU28441.1
SvRSV_PRB	NC_079102.1	YP_010840884.1
LigLV_CDB	NC_079105.1	YP_010840892.1
LigCSV_SPA	NC_079104.1	YP_010840889.1
HYBV	MT472638.1	QRG34868.1
PisV-Y	MT362605.1	QPL17816.1
HGSV2_ES	OR161047.1	WMQ58800.1
PisV-X	MT334618.1	QPL17810.1

4.2 Desenvolvimento de construções para a expressão transiente das proteínas P61 de CiLV-C CRD/SJP e P62 de PfGSV, SvRSV e CiLV-C2

4.2.1 Clonagem em pGEM T-Easy

A partir de amostras positivas de cDNA dos vírus CiLV-C CRD/SJP, PfGSV, SvRSV e CiLV-C2, disponíveis no laboratório, realizou-se a amplificação das ORFs por PCR (*polimerase chain reaction*) utilizando iniciadores específicos para cada uma delas. Os iniciadores foram desenvolvidos para adicionar as sequências dos sítios de restrição *NcoI* no extremo 5', necessário para a expressão correta do gene devido a presença do fragmento de Kozak (Kozak, 2002), e *XbaI* ao extremo 3' (Tabela 2), com exceção para a ORF *p62* de CiLV-C2, onde foi adicionado um sítio *BamHI* no extremo 5' devido a presença de um sítio *NcoI* no interior da sequência da *p62*. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, os amplicons de tamanho desejado (~1,6 Kb) foram purificadas do gel utilizando o kit Wizard® SV Gel e PCR Clean Up

⁹ MOTIF: Searching Protein Sequence Motifs - GenomeNet

System (Promega, Madison, WI, EUA), e o produto da purificação foi quantificado com o espectrofotômetro Nanodrop 6000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Em seguida, os produtos de PCR purificados foram inseridos no vetor pGEM T-Easy (Promega, WI, EUA) por reação de ligação utilizando enzima T4-DNA ligase (3U/ μ l) (Promega, WI, EUA). Para determinar as quantidades de vetor e fragmento de interesse para o processo de clonagem foi utilizada a equação: $(100 \text{ ng do vetor} \times \text{quantidade de pares de base do fragmento de interesse}) \div (\text{quantidade de pares de base do vetor})$. O resultado em nanogramas foi multiplicado por três e adicionado à reação de ligação, em seguida as amostras foram incubadas a 4°C no escuro por 12 horas.

Tabela 2 - Lista de iniciadores para a amplificação das ORFs *p61* de CiLV-C (CRD e SJP) e *p62* de PfGSV, SvRSV e CiLV-C2.

Vírus	Sequência dos iniciadores	
CiLV-C_CRD	F: 5'-NcoI - ATGCCATGGGGCTATTTTCAGCT - 3' R: 5' - XbaI - GCTCTAGATTACAAATCAATGGTTTCAGC - 3'	(Arena et al., 2020)
CiLV-C_SJP	F: 5'-NcoI - ATGCCATGGGGCTATTTTCAGCT - 3' R: 5' - XbaI - GCTCTAGATTATAAATCAATGGTATCAGC - 3'	Ramos-González <i>et al.</i> , - dados não publicados
PfGSV	F: 5'-NcoI - ATGCCATGGACTTCTTAGCTGTTTAC - 3' R: 5' - XbaI - GCTCTAGATTAGAAAGTCCAGCTAATAAC - 3'	
SvRSV	F: 5' - NcoI - ATGCCATGGATCTGTAAAGTTTTTACT - 3' R: 5' - XbaI - GCTCTAGACTAATAGTTGAATTGATCAAC - 3'	
CiLV-C2	F: 5' - BamHI - CGGGATCCACAATGGATTTTATACCGTGTA - 3' R: 5' - XbaI - GCTCTAGATTAGAAGGAAGACGCGACAGC - 3'	

Os produtos das ligações foram dialisados em membranas *Millipore* de 0,025 nm e transformados por eletroporação em células competentes de *Escherichia coli* 10 β . As culturas transformadas foram incubadas em 1 mL de meio LB (Luria-Bertani) sem antibiótico a 37°C com agitação leve por 1 hora, espalhadas em placas de LB sólido contendo ampicilina (100 mg/mL), IPTG (24 mg/mL) e X-Gal (50 mg/mL) e mantidas a 37°C durante a noite. A partir da confirmação visual de colônias brancas positivas, foram realizado o teste de PCR de colônia utilizando iniciadores para regiões externas à inserção do gene clonado com o objetivo de verificar a presença dos amplicons esperados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%. Colônias referentes aos clones positivos foram cultivadas em 4 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 mg/mL) a 37°C durante a noite. Os DNAs plasmidiais foram extraídos usando o método de lise alcalina descrito por Birnboim (1989), seguidos pela digestão com a enzima de restrição *Bam*HI (10U/ μ L) (Promega, WI, EUA) e *Eco*RI (10U/ μ L) (New England Biolabs, MA, EUA) para a confirmação a construção. Clones que apresentaram fragmentos com tamanhos esperados foram purificados com o Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, WI, EUA) e sequenciados pelo método Sanger utilizando iniciadores específicos. Após a análise e confirmação das sequências utilizando software Vector NTI

(Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), os clones foram mantidos em placas de LB sólido com ampicilina e replicados a cada 15 dias para a segunda etapa da clonagem.

4.2.2 Clonagem no vetor p35S_IB

A partir dos clones confirmados, os fragmentos referentes às ORFs *p61* de CiLV-C CRD/SJP e *p62* de PfGSV, SvRSV e CiLV-C2 foram introduzidos no vetor p35S_IB (Ramos-González, dados não publicados) para a construção da unidade transcricional, que contém o promotor 35S de cauliflower mosaic virus (CaMV, *Caulimovirus tessellobrassicae*), o fragmento ômega 8 de tobacco mosaic virus (TMV, *Tobamovirus tabaci*) e o terminador *Tnos* de *Agrobacterium tumefaciens*. Colônias isoladas de *Escherichia coli* 10 β transformadas com o vetor pGEM T-Easy contendo os fragmentos clonados foram cultivadas independentemente em meio LB líquido com ampicilina (100 mg/mL) a 37°C e 150 rpm durante a noite. A purificação dos plasmídeos foi realizada utilizando o Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, WI, EUA) e a quantificação foi feita com o Nanodrop 6000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

Os plasmídeos pGEM T-Easy contendo as ORFs *p61/p62* (3000 ng) e o vetor p35S_IB (2000 ng) foram digeridos separadamente por 1 hora a 37 °C com enzimas de restrição. Para as construções contendo a *p61* de CiLV-C CRD/SJP e a *p62* de SvRSV e PfGSV, utilizou-se a enzima *HindIII* (10 U/ μ L) (Promega, WI, EUA). Já para a construção contendo a *p62* de CiLV-C2, foi utilizada a enzima *PstI* (10 U/ μ L) (Promega, WI, EUA), devido à presença de um sítio de restrição *HindIII* na sequência da ORF *p62*. Foi adicionado 1uL (20U/ μ L) de fosfatase alcalina à reação de digestão do vetor p35S_IB após 30 minutos para prevenir a recircularização. O material foi separado por eletroforese em gel de agarose, e as bandas referentes ao vetor p35S_IB (3 kb) e às ORFs *p61/p62* (1,6 – 1,8 kb) foram coletadas, purificadas com o Kit Wizard® SV Gel e PCR Clean Up System (Promega, WI, EUA), quantificadas e submetidas à reação de ligação conforme descrito na sessão 4.2.1. As construções finais foram então transformadas por eletroporação em células competentes de *E. coli* 10 β e confirmadas a partir da digestão utilizando as enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI*.

4.2.3 Clonagem no vetor binário pCAMBIA 2300 e transformação em *Agrobacterium tumefaciens* linhagem AGL-1

Os genes *p61* de CiLV-C_CRD e SJP, e *p62* de PfGSV e SvRSV, previamente incorporados nas unidades transcricionais do vetor p35S_IB, foram inseridos individualmente no vetor binário pCAMBIA 2300. Colônias isoladas de cada construção

foram cultivadas e o DNA plasmidial foi purificado e quantificado conforme descrito na sessão 4.2.2. As construções p35S_IB contendo as respectivas *p61/p62* (3000 ng) e o vetor pCAMBIA 2300 (2000 ng) foram digeridas separadamente com as enzimas de restrição *Pst*I ou *Hind*III (10U/ μ l) e incubadas a 37°C por 1 hora. Adicionou-se 1 μ L (20U/ μ L) de fosfatase alcalina ao vetor pCAMBIA 2300 após 30 minutos de digestão para evitar a recircularização do vetor. Os produtos das digestões foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e os fragmentos referentes ao vetor pCAMBIA 2300 (8,7 kb) e às construções p35S_IB *p61/p62* (~6 kb) foram coletadas, purificadas, quantificadas, submetidas à reação de ligação conforme descrito na sessão 4.2.1.

Os produtos das ligações foram dialisados e transformados por eletroporação com células competentes de *E. coli* 10 β . Em seguida, colônias isoladas foram cultivadas em meio LB líquido para a extração dos plasmídeos e confirmação da digestão com enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI. A partir dos clones confirmados, os plasmídeos referentes a cada construção foram transformados por choque térmico utilizando células competentes de *A. tumefaciens* linhagem AGI-1. As culturas transformadas foram mantidas em meio LB sem antibiótico por 4 horas a 27°C e agitação leve, em seguida foram transferidas para placas de LB sólido com os antibióticos canamicina (50 μ g/mL) e rifampicina (15 μ g/mL) e incubadas a 27°C durante dois dias. Colônias individuais foram selecionadas, seus plasmídeos extraídos e submetidos à transformação reversa para confirmação da clonagem. Esse processo consiste na extração dos plasmídeos de colônias de *Agrobacterium tumefaciens*, seguida da eletroporação desses plasmídeos em células de *Escherichia coli* 10 β , com posterior confirmação por digestão com enzimas de restrição.

As enzimas de restrição foram escolhidas com base no critério de que seus sítios de corte estivessem presentes em posições distintas nas ORFs *p61/p62*. Todos os padrões de digestão foram previamente simulados no software Vector-NTI (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) para garantir que fossem distintos entre as diferentes construções, evitando possíveis ambiguidades na análise. Os clones referentes às construções presentes em *A. tumefaciens* foram digeridos com as enzimas *Bam*HI (10U/ μ L) (Promega, WI, EUA) e *Eco*RI (10U/ μ L) (New England Biolabs, MA, EUA), aqueles referentes aos que apresentaram bandas de tamanhos esperados foram replicados em placas de LB sólido com canamicina (50 μ g/mL) e rifampicina (10 μ g/mL), além de serem mantidas culturas permanentes em glicerol 50% em ultrafreezer a -80°C.

4.3 Cultivo de plantas de *Nicotiana benthamiana* e ensaios de agroinfiltração

Em fitocâmara Conviron Adaptis 1000 (Conviron, MB, Canadá), foram cultivadas plantas de *N. benthamiana* do genótipo WT (*wild type*). Em vasos contendo a mistura de substrato Vivatto Pro20 (Vivatto, SP, Brasil) com vermiculita (3:1) e umidificados com solução nutritiva (Fe-EDTA, nitrato de potássio - KNO_3 , fosfato monoamônico - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e micronutrientes), sementes de *N. benthamiana* foram dispostas nos vasos e cobertas com plástico filme para manter a umidade por cerca de uma semana até a germinação. Os vasos com sementes foram mantidos em fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão a 24°C por 3 ou 4 semanas. Após a germinação, os plásticos foram retirados e as plantas foram mantidas por 3 a 4 semanas, até serem utilizadas para o experimento de agroinfiltração.

A agroinfiltração foi realizada conforme o protocolo descrito por Baulcombe (2019). Para o ensaio, colônias isoladas de *A. tumefaciens* cepa AGL-1 contendo as construções pCAMBIA 2300 p35S_IB-p61 de CiLV-C dos isolados CRD, SJP e vetor vazio (EV), foram inoculadas em tubos Falcon com 5 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos canamicina (50 $\mu\text{g/mL}$) e rifampicina (10 $\mu\text{g/mL}$), sendo incubadas a 27 °C com agitação a 150 rpm. Após esse período, a densidade óptica (OD_{600}) das culturas foi monitorada periodicamente até que fosse alcançado o valor de $\text{OD}_{600} = 0,6$. Em seguida, alíquotas de 100 μL dessas culturas foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de LB suplementado com canamicina (50 $\mu\text{g/mL}$), rifampicina (10 $\mu\text{g/mL}$) e acetoseringona (150 μM), sendo incubadas novamente a 27 °C com agitação a 150 rpm até atingirem $\text{OD}_{600} = 0,6$. As culturas foram então centrifugadas a $4.000 \times g$ por 20 minutos a 20 °C, e os pellets bacterianos foram ressuspensos em solução de infiltração MMA (10 mM MES, pH 5,6; 10 mM MgCl_2 ; 150 μM acetoseringona). As densidades ópticas foram reavaliadas e ajustadas para $\text{OD}_{600} = 0,6$ utilizando a própria solução MMA.

As suspensões de *A. tumefaciens* foram mantidas em repouso por 4 horas à temperatura ambiente, em condições de escuro, antes da realização da agroinfiltração. Para o ensaio, foram selecionadas dez plantas de *N. benthamiana* por tratamento, com desenvolvimento vegetativo uniforme. A infiltração foi realizada na face abaxial das folhas utilizando seringas sem agulha. Em cada planta, três folhas foram selecionadas para o procedimento, seguindo a ordem da folha mais velha (inferior) para a mais jovem (superior), totalizando 30 réplicas por tratamento.

4.4 Padronização do protocolo para extração de RNA total de folhas de *Nicotiana benthamiana*, síntese de cDNA e ensaios de qPCR

A extração de RNA total das folhas de *N. benthamiana* foi realizada conforme protocolo adaptado de Oñate-Sánchez e Vicente-Carbajosa (2008). De cada planta, foram coletados três discos foliares (~70–90 mg), que foram macerados em nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, foram adicionados diretamente ao almofariz 600 µL da solução de lise celular (2% SDS, 68 mM citrato de sódio, 132 mM ácido cítrico e 1 mM EDTA). As amostras foram transferidas para microtubos de 2 mL e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse período, foram adicionados 300 µL da solução de precipitação proteína-DNA (4 M NaCl, 16 mM citrato de sódio, 32 mM ácido cítrico), com homogeneização suave e incubação a 4 °C por 10 minutos.

As amostras foram então centrifugadas a $12.000 \times g$, a 4 °C, por 10 minutos, e o sobrenadante transferido para um novo tubo contendo 600 µL de isopropanol. Após homogeneização por inversão, as amostras foram centrifugadas por 4 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pellet resultante foi lavado com etanol 70% gelado, seguido de nova centrifugação a 4 °C por 2 minutos. O pellet foi então seco ao ar e ressuspenso em 16 µL de água tratada com DEPC, 2 µL de 10x *DNase I Reaction Buffer* (100mM Tris-HCL pH 7.5, 25mM MgCl₂, 1mM CaCl₂) e 2 µL de DNase I - RNase Free (1 U/µl) (Thermo Fisher, MA, EUA), com incubação a 37 °C por 30 minutos para digestão de DNA genômico residual.

Após a digestão, foram adicionados 80 µL de água tratada com DEPC, 50 µL de acetato de sódio 3 M e 400 µL de etanol absoluto. A mistura foi centrifugada a 4 °C por 20 minutos, e o pellet lavado com etanol 70% gelado, seguido de centrifugação a 4 °C por 2 minutos. O pellet seco foi ressuspenso em 20 µL de água tratada com DEPC. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotometria em Nanodrop 6000 (Thermo Fisher, MA, EUA), e a integridade das amostras foi avaliada visualmente por eletroforese em gel de agarose a 1%. Posteriormente, foi realizada a homogeneização das amostras para uso experimental.

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de valores ajustados de acordo com a homogeneização do RNA total. Para a reação, foram utilizados iniciadores randômicos e a enzima GoScript Reverse Transcriptase (Promega, WI, EUA). Para o ensaio de RT-qPCR foi utilizado o GoTaq qPCR Master Mix (Promega, WI, EUA) e realizada a diluição do cDNA de cada amostra para a concentração final de 50 ng/µL, sendo utilizados 2µL por reação. Todas as reações foram conduzidas em réplicas

utilizando o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System Device (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

Um ensaio piloto foi conduzido para avaliar a adequação do protocolo de extração de RNA descrito por Oñate-Sánchez e Vicente-Carbajosa (2008), originalmente desenvolvido para *A. thaliana*, à espécie *N. benthamiana*. Além disso, buscou-se evitar o uso do método padrão do laboratório, baseado em fenol:clorofórmio, devido ao potencial de resíduos interferirem na RT-qPCR. Para este teste, três discos foliares (~70–90 mg) foram coletados de seis folhas distintas de plantas não agroinfiltradas de *N. benthamiana*, formando uma amostra composta (pool). Ao todo, foram obtidas seis amostras independentes ($n = 6$), cada uma representando um tratamento. A extração de RNA foi realizada sob diferentes condições experimentais (T1 a T6), com o objetivo de otimizar a eficiência do protocolo. Os tratamentos T1 e T2 foram submetidos ao protocolo completo de extração, conforme descrito anteriormente. Nos tratamentos T3 e T4, 1 µg de RNA total foi tratado com DNase. No tratamento T5, após a adição de 80 µL de água tratada com DEPC, 50 µL de acetato de sódio 3 M e 400 µL de etanol absoluto, a amostra foi mantida a -80°C por 12 horas, com o objetivo de aumentar a eficiência da precipitação de proteína-DNA residual. O tratamento T6 consistiu na digestão de 1 µg de RNA com DNase, seguida da etapa de precipitação a -80°C por 12 horas, conforme realizado em T5. Controles sem transcriptase reversa foram incluídos para cada amostra, a fim de avaliar a qualidade do RNA e detectar possível contaminação com DNA genômico residual, uma vez que os iniciadores utilizados para o ensaio de RT-qPCR não distinguem sequências de mRNA das correspondentes no DNA genômico.

Para o ensaio piloto de RT-qPCR, foram utilizadas duas réplicas por tratamento e iniciadores para o gene actina (Tabela 3), nas concentrações de 400 nM e 600 nM. Os dados obtidos foram analisados com o software LinRegPCR (Untergasser et al., 2021). As médias dos valores de Cq foram calculadas considerando as diferentes concentrações dos primers ($n = 6$) e uma amostra de RNA por tratamento ($n = 1$). A normalidade dos dados para cada concentração de iniciador (400 nM e 600 nM) foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade de variâncias entre os grupos, pelo teste de Levene. A comparação entre as médias dos grupos foi realizada utilizando o teste t de Student com a suposição de variâncias iguais. As análises foram conduzidas no ambiente RStudio (R Core Team, 2021), com o uso dos pacotes car, dplyr, ggplot2 e FSA.

Adicionalmente para o ensaio piloto, foram avaliadas as diferenças entre as médias de Cq dos tratamentos de RNA (T1 a T6) por meio do teste de Kruskal-Wallis, como análise estatística não-paramétrica exploratória. Todas as análises foram realizadas no

software Rstudio (R Core Team, 2021). Os gráficos foram gerados a partir dos valores médios de Cq obtidos para cada tratamento.

4.5 Ensaio de RT-qPCR a para o gene bZIP60 de *Nicotiana benthamiana* 24 horas após a expressão transiente da proteína P61 de CiLV-C_CRD, CiLV-C_SJP e o vetor vazio (EV).

Vinte e quatro horas após a realização do ensaio de agroinfiltração para a expressão da proteína P61 do isolado CiLV-C_CRD/SJP (conforme descrito na seção 4.3), foi coletado um disco foliar de cada uma das folhas agroinfiltradas de *Nicotiana benthamiana*. Em seguida, os discos foliares provenientes de uma mesma planta foram reunidos, totalizando uma amostra composta de aproximadamente 70 a 90 mg, formada por três discos foliares por planta. No total, foram obtidas dez amostras compostas para cada tratamento (n = 10). Em seguida, foi realizada a extração de RNA total utilizando como padrão o tratamento T1 e T2 e síntese de cDNA conforme descrito na sessão 4.4. Para a RT-qPCR, foi utilizado o GoTaq qPCR Master Mix (Promega, WI, EUA), 100 ng de cDNA e 600 nM de iniciadores para o gene de interesse *bZIP60* e *actina* (Tabela 3) como gene normalizador.

As eficiências de amplificação e os valores de Cq de cada reação foram obtidos utilizando o software LinRegPCR (Untergasser et al., 2021). Os valores de Cq foram normalizados pelo método ΔCq ($Cq_{Alvo} - Cq_{Referência}$). Em seguida, os ΔCq das amostras foram comparados à média do grupo controle (EV) para o cálculo do $\Delta\Delta Cq$. A expressão relativa foi determinada com base no método de Pfaffl (2001), que considera a eficiência de amplificação de cada par de primers, utilizando a fórmula: $FoldChange = (E_{bZIP60}/E_{Actina})^{\Delta\Delta Cq}$. Neste experimento, as eficiências foram de 1,88 para *bZIP60* e 1,77 para *actina*. Os valores de $\Delta\Delta Cq$ foram aplicados diretamente na equação para o cálculo individual do fold change de expressão relativa para cada amostra. Os dados de fold change foram então submetidos à análise estatística.

A normalidade da distribuição foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Levene. Como os dados atenderam aos pressupostos paramétricos, foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) para comparação entre os grupos CRD, SJP e EV, seguida pelo teste pós-hoc de Tukey HSD (Honestly Significant Difference), adotando-se um nível de significância de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software Rstudio (R Core Team, 2021).

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores para o gene *actina* e *bZIP60*

Gene	Sequência do primer	Referência
Actina	F: TCCATGCTCAATGGGATACT R: TTCAACCCCTTGTCTGTGAT	(GÓMEZ <i>et al.</i> , 2020)
bZIP60	F: AATCAACGAAGCAGAAACCACG R: TGCCCATCATTAAGGACAGGAA	(Li <i>et al.</i> , 2018)

5 RESULTADOS

5.1 Análises *in silico* para as ORFs e proteínas homólogas a P61 de CiLV-C dos kitavírus

As análises de similaridade entre sequências nucleotídicas e de aminoácidos identificaram 13 homólogos da proteína P61 de CiLV-C. Esses homólogos estão distribuídos entre vírus de oito espécies do gênero *Cilevirus* — CiLV-C_CRD, CiLV-C_SJP, CiLV-C_ASU, CiLV-C2_COL, CiLV-C2_HAW, PfGSV_SNP, PfGSV_BJL, SvRSV_PRB, LigLV_CBD, LigCSV_SPA, HYBV e PisV-Y — e duas do gênero *Higrevirus* — PisV-X e HGSV2_ES (Tabela 1). O alinhamento múltiplo de sequências e a matriz de identidade de nucleotídeos e aminoácidos revelaram os clusters com maior valor de identidade observados nas árvores filogenéticas geradas pelo software IQtree (Figura 3). A presença de peptídeo sinal (PS) em uma proteína indica seu direcionamento para a rota secretora do retículo endoplasmático (RE), onde ocorrem modificações pós-traducionais essenciais para o funcionamento e estabilidade da proteína (Von Heijne, 1998). As análises de predição de PS (Tabela 4) revelaram variações entre as proteínas homólogas a P61 de CiLV-C dos diferentes vírus analisados. Alta probabilidade de presença de PS (valor de $p > 0,9$) foi observada nas proteínas de CiLV-C_CRD, CiLV-C_SJP, CiLV-C_ASU, HGSV2_ES, PfGSV_SNP, PfGSV_BJL, SvRSV_PRB e PisV-Y. Probabilidades intermediárias ($0,3 \leq p \leq 0,6$) foram encontradas nas proteínas de CiLV-C2_COL, LigLV_CBD e HYBV. Já as proteínas homólogas a P61 de CiLV-C2_HAW e PisV-X apresentaram valor de $p = 0$, indicando ausência de PS detectável. Ainda assim, as predições para a localização subcelular indicaram, para todas as proteínas analisadas, alta probabilidade de direcionamento ao RE ($p > 0,8$), independentemente da presença ou ausência de PS clássico (Tabela 4).

Complementarmente, a predição de domínios transmembranares (DTs), estruturas associadas à ancoragem de proteínas nas membranas celulares (Sonnhammer; Von Heijne; Krogh, 1998), revelou que, com exceção de PisV-Y_IRA, todas as proteínas apresentam pelo menos um DT. As proteínas de CiLV-C_CRD, CiLV-C_ASU, SvRSV_PRB, LigLV_CBD e LigCSV_SPA foram classificadas como monotópicas, contendo um único domínio transmembrana. As de CiLV-C_SJP, HGSV2_ES, PfGSV_SNP e PfGSV_BJL foram bitópicas, com dois DTs. Já as de CiLV-C2_COL,

CiLV-C2_HAW e HYBV foram tritópicas. A proteína de PisV-X apresentou o maior número de DTs, sendo pentatópica, enquanto PisV-Y não apresentou DTs detectáveis.

Adicionalmente, a predição de sítios de N-glicosilação (N-glyc), uma modificação pós-traducional associada à estabilidade da proteína e interações moleculares (Stanley, 2022), indicou a presença variável desses motivos entre as proteínas. As proteínas de HGSV2_ES e SvRSV_PRB apresentaram um único sítio potencial, enquanto CiLV-C_SJP, CiLV-C_ASU, LigLV_CBD, HYBV e PisV-Y apresentaram dois. A proteína de CiLV-C_CRD apresentou três sítios, e aquelas de PfGSV_SNP PfGSV_BJL, LigCSV_SPA, PisV-X_IRA, CiLV-C2_COL e CiLV-C2_HAW exibiram quatro ou mais sítios N-glyc potenciais (Tabela 4).

Tabela 4 - Conjunto de predições *in silico* realizadas pelos softwares SignalP 6.0 para determinar a presença de peptídeo sinal (PS), DeepLoc 2.1 para a localização subcelular no retículo endoplasmático (RE), NetGlyc 1.0 para determinar a quantidade de sítios de N-glicosilação (N-glyc) e TMHMM 2.0 para avaliar a quantidade de domínios transmembrana (DTs)

Vírus	PS	Localização no RE	N-Glyc	TM
CiLV-C_CRD	0,999	0,862	3	1
CiLV-C_SJP	0,996	0,876	2	2
CiLV-C_ASU	0,995	0,863	2	1
CiLV-C2_COL	0,444	0,852	7	3
CiLV-C2_HAW	0	0,853	7	3
PfGSV_SNP	0,999	0,810	4	2
PfGSV_BJL	0,999	0,848	4	2
SvRSV_PRB	0,999	0,807	1	1
LigLV_CDB	0,602	0,824	2	1
LigCSV_SPA	0,999	0,842	4	1
PisV-Y_IRA	0,999	0,895	2	0
PisV-X_IRA	0	0,864	6	5
HGSV2_ES	0,999	0,876	1	2
HYBV_HAW	0	0,860	2	3

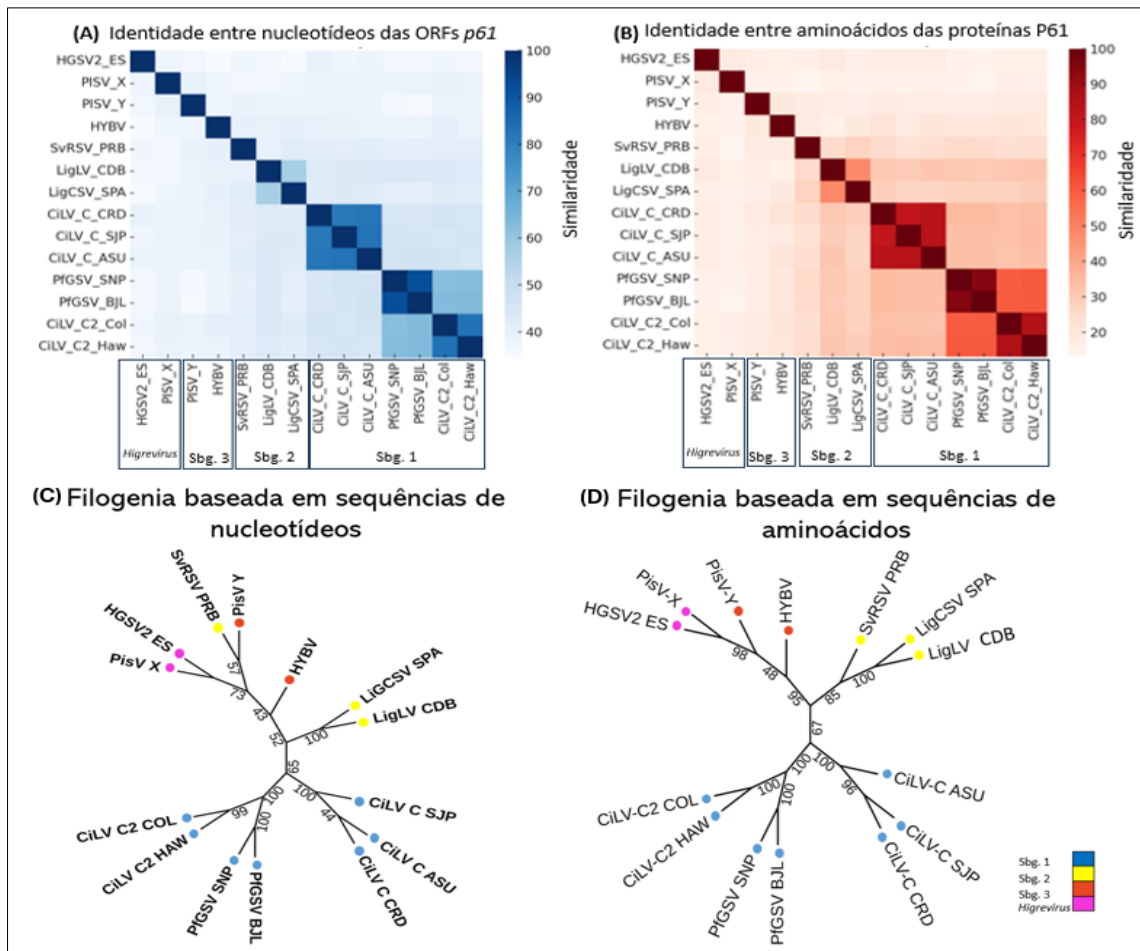


Figura 3 - Representação de identidade entre as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos das P61 homólogas à de CiLV-C_CRD. **(A)** Matriz de identidade de nucleotídeos para as ORF p56/p61/p62/p65/p66/p69. **(B)** Matriz de identidade para as seqüências de aminoácidos das proteínas P56/P61/P62/P65/P66/P69 de kitavírus. **(C)** Árvore filogenética das ORFs homólogas à p61 de CiLV-C_CRD. **(D)** Árvore filogenética das proteínas P61 homólogas à de CiLV-C_CRD.

5.2 Análise *in silico* de motivos presentes nas proteínas homólogas à P61 de CiLV-C_CRD dos kitavírus

As análises *in silico* realizadas com a ferramenta MotifFinder da GenomeNet, utilizando os bancos PROSITE, Pfam e NCBI-CDD com *E-value* de corte em 1,0, permitiram identificar dez motivos conservados nas proteínas de cilevírus e higrevírus. De modo geral, domínios detectados pela base NCBI-CDD e Pfam que apresentaram *E-values* próximos de 0,1 foram considerados estatisticamente mais confiáveis e indicam maior probabilidade de correspondência funcional real, valores acima de 0,5 foram considerados putativos, devendo ser estudados mais a fundo futuramente. Os domínios identificados pela base de dados PROSITE não apresentam valores estatísticos fornecidos pela ferramenta.

No subgrupo 1, a proteínas pertencentes aos vírus das três estirpes do CiLV-C (CRD, SJP e ASU) apresentaram o domínio ALBUMIN_1 (PROSITE: PS00212) entre as posições 470–494. A proteína de CiLV-C_CRD também apresentou o domínio RRM1_hnRPLL (NCBI-CDD: cd12781) entre as posições 144–197 (*E-value* = 0.44),

enquanto a proteína de CiLV-C_SJP apresentou o domínio Rrp44_S1 (NCBI-CDD: 435792) entre as posições 293–339 (*E-value* = 0.52). A proteína P62 de PfGSV_BJL apresentou o domínio LECTIN_LEGUME_BETA (PROSITE: PS00307) entre as posições 17–23. As proteínas P62 de CiLV-C2_COL e CiLV-C2_HAW não apresentaram motivos funcionais detectáveis com os parâmetros utilizados.

Nos vírus do subgrupo 2, a P62 do SvRSV_PRB apresentou o domínio ALBUMIN_1 (PS00212) entre as posições 487–511 e o domínio FMO GS-OX (NCBI-CDD: PLN02172) entre as posições 212–28 (*E-value* = 0.15). A P62 do LigLV_CDB apresentou o domínio GemC1_CC (NCBI-CDD: cd22588) entre as posições 368–386 (*E-value* = 0.83). A proteína P61 do LigCSV_SPA apresentou dois domínios sobrepostos: um de ADP-ribosiltransferase (NCBI-CDD: PHA02566) entre as posições 392–444 (*E-value* = 0.72) e o domínio PF19929 (Pfam: DUF6392) pertencente a uma família desconhecida, entre as posições 393–434 (*E-value* = 0.21).

Para os vírus do subgrupo 3, a proteína P69 do PisV-Y apresentou o domínio PRK06798/fliD (NCBI-CDD: 180698), entre as posições 204–323 (*E-value* = 0.078). A P56 do HYBV não apresentou domínios além dos motivos pós-traducionais comuns entre todas. Entre os higravírus, a P66 do PisV-X apresentou o domínio major head protein (NCBI-CDD: PHA00144), entre as posições 105–181 (*E-value* = 0.58), enquanto a proteína de HGSV2_ES apresentou o sítio de fosforilação TYR_PHOSPHO_SITE_2 (PROSITE: PS60007), entre as posições 334–340.

Além dos domínios específicos citados, todas as proteínas analisadas apresentaram um conjunto comum de motivos pós-traducionais conservados. O domínio ASN_GLYCOSYLATION (PROSITE: PS00001), compatível com sítios de N-glicosilação, foi identificado em todas as sequências, com posições e quantidades conforme descrito nas análises realizadas a predição de sítios de N-glyc na seção 5.1. O domínio MYRISTYL (PROSITE: PS00008), relacionado à N-myristoylação e associação à membrana, também foi detectado em todas as proteínas. Adicionalmente, foram identificados sítios de fosforilação correspondentes aos domínios CK2_PHOSPHO_SITE (PS00006) e PKC_PHOSPHO_SITE (PS00005), presentes em todas as proteínas analisadas. O domínio CAMP_PHOSPHO_SITE (PROSITE: PS00004), associado à fosforilação mediada por quinases dependentes de cAMP/cGMP, foi identificado especificamente nas proteínas dos vírus CiLV-C2_COL, LigLV_CDB, LigCSV_SPA, HYBV e HGSV2_ES.

Tabela 5 - Motivos identificados pelo software *MotifFinder* para as proteínas possíveis glicoproteínas dos kitavírus

Vírus	Motivos identificados nas proteínas					
CiLV-C_CRD	ABULMIN_1	RRM1_hnRP LL		CK2_PHOSPHO	PKC_PHOSPHO	N-myristoylation
CiLV-C_SJP	ABULMIN_1	Rrp44_S1		CK2_PHOSPHO	PKC_PHOSPHO	N-myristoylation
CiLV-C_ASU	ABULMIN_1			CK2_PHOSPHO	PKC_PHOSPHO	N-myristoylation
CiLV-C2_COL			CAMP_PHOSPHO	CK2_PHOSPHO	PKC_PHOSPHO	N-myristoylation
CiLV-C2_HAW				CK2_PHOSPHO	PKC_PHOSPHO	N-myristoylation
PfGSV_SNP				CK2_PHOSPHO	PKC_PHOSPHO	N-myristoylation
PfGSV_BJL	LECTIN_LEGUME_BE TA			CK2_PHOSPHO	PKC_PHOSPHO	N-myristoylation
SvRSV_PRB	ABULMIN_1	FMO GS-OX		CK2_PHOSPHO	PKC_PHOSPHO	N-myristoylation
LigLV_CDB	GemC1_CC		CAMP_PHOSPHO	CK2_PHOSPHO	PKC_PHOSPHO	N-myristoylation
LigCSV_SPA	ADP-ribosyltransferase	PF19929 (DUF6392)	CAMP_PHOSPHO	CK2_PHOSPHO	PKC_PHOSPHO	N-myristoylation
PISV-Y				CK2_PHOSPHO	PKC_PHOSPHO	N-myristoylation
PisV-X	major head protein			CK2_PHOSPHO	PKC_PHOSPHO	N-myristoylation
HGSV2_ES			CAMP_PHOSPHO	CK2_PHOSPHO	PKC_PHOSPHO	N-myristoylation
HYBV			CAMP_PHOSPHO	CK2_PHOSPHO	PKC_PHOSPHO	N-myristoylation

5.3 Confirmação das construções pCAMBIA 2300 p35S_IB contendo as ORFs *p61* de CiLV-C CRD/SJP e *p62* de PfGSV, SvRSV e CiLV-C, mediante o perfil de digestão por enzima de restrição

As construções do vetor binário pCAMBIA 2300 p35S_IB contendo individualmente as ORFs *p61* de CiLV-C_CRD, CiLV-C_SJP e *p62* de PfGSV, SvRSV e CiLV-C2, juntamente com o vetor vazio (EV), conforme ilustrado na Figura 4A, foram avaliadas por meio da simulação dos respectivos padrões de digestão no software Vector NTI (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) (Figura 4B). As enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI* foram selecionadas por apresentarem perfis de digestão distintos entre as construções. Após a digestão, os plasmídeos foram visualizados em gel de agarose a 1% (Figura 4C).

A construção pCAMBIA 2300 p35S_IB EV (poço 1) apresentou fragmentos de 8,9 kb e 1,4 kb. No poço 2, correspondente à construção pCAMBIA 2300 p35S_IB p61 CiLV-C_CRD, foram observados fragmentos de 9,9 kb, 1,2 kb e 660 pb. Os clones da construção p61 CiLV-C_SJP (poço 3) exibiram fragmentos de 10,9 kb, 976 pb e 968 pb sobrepostos. A construção p62 PfGSV (poço 4) apresentou fragmentos de 10,1 kb, 1,2 kb e 766 pb. Os clones da construção p62 SvRSV (poço 5) exibiram fragmentos de 9,5 kb, 1,4 kb, 686 pb e 477 pb. Por fim, a construção p62 CiLV-C2 (poço 6) apresentou fragmentos de 10,1 kb, 1,4 kb e 416 pb. Os resultados confirmam o sucesso das construções e a especificidade dos padrões de digestão simulados e observados experimentalmente.

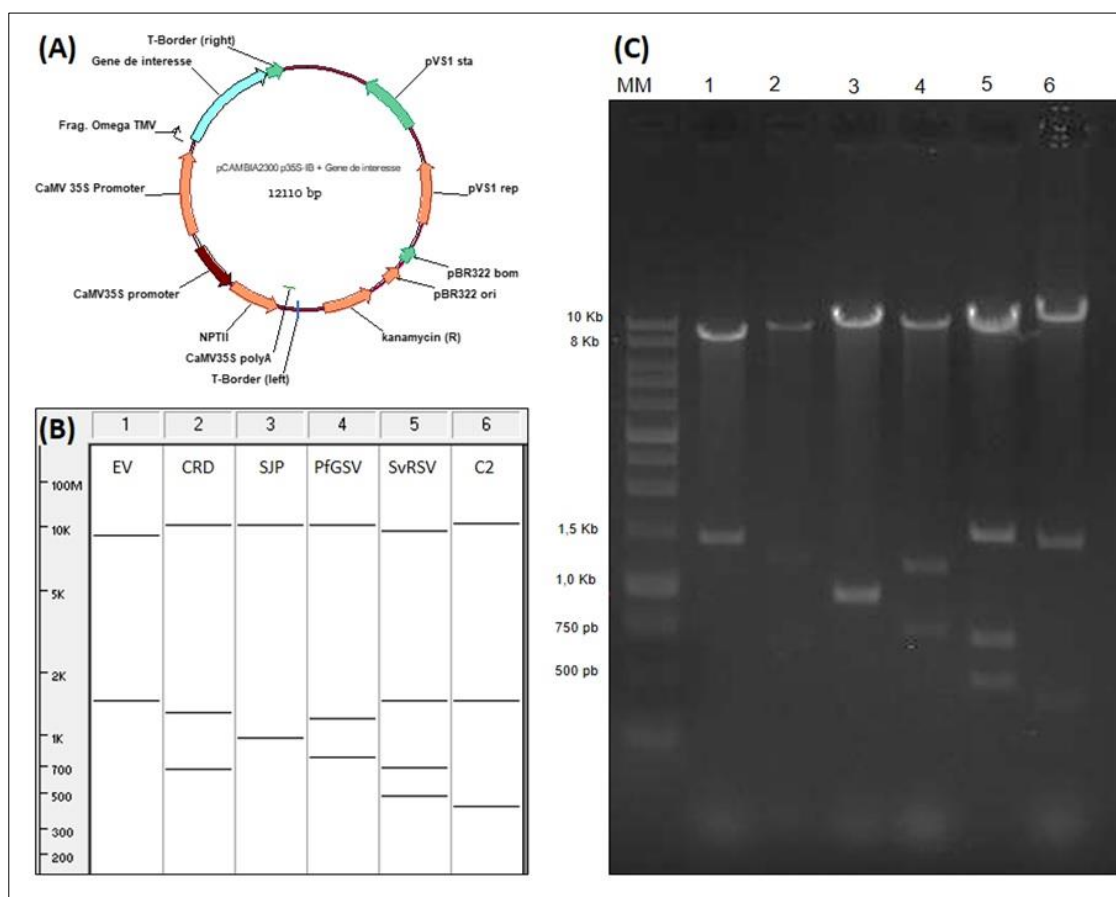


Figura 4- Representações esquemáticas e análise dos plasmídeos pCAMBIA 2300 p35S IB contendo genes virais. **(A)** Mapa gerado no software Vector NTI do plasmídeo pCAMBIA 2300 p35S IB, destacando em azul claro a região de inserção do gene de interesse. A unidade transcripcional é composta pelo promotor constitutivo CaMV 35S, o fragmento translacional ω (ômega) do vírus do mosaico do tabaco (TMV), o gene viral de interesse e o terminador *Tnos* de *Agrobacterium tumefaciens*. **(B)** Simulação do padrão de digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI, indicando os perfis esperados para as seguintes construções: poço 1 – vetor vazio (EV); poço 2 – *p61* de CiLV-C_CRD; poço 3 – *p61* de CiLV-C_SJP; poço 4 – *p62* de PfGSV; poço 5 – *p62* de SvRSV; poço 6 – *p62* de CiLV-C2. **(C)** Análise em gel de agarose a 1% dos plasmídeos digeridos com *Bam*HI e *Eco*RI, utilizando marcador de peso molecular (MM) de 1 kb (Invitrogen).

5.4 Validação do protocolo de extração de RNA e ensaios de qPCR em *N. benthamiana*

A padronização dos protocolos para extração de RNA total de folhas de *Nicotiana benthamiana* e a realização dos ensaios de qPCR visaram garantir a qualidade do RNA e aumentar a precisão nas análises de expressão gênica. As médias de Cq foram de $30,33 \pm 0,75$ para 400 nM ($n = 12$) e $26,45 \pm 0,70$ para 600 nM ($n = 12$) (Figura 5A).

A normalidade dos dados das médias Cq para cada concentração de iniciador, foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk que apontou valores de $p = 0,9059$ para 400 nM e $p = 0,5002$ para 600 nM, indicando distribuição normal em ambos os grupos. A homogeneidade de variâncias foi confirmada pelo teste de Levene ($F = 0,0609$; $p = 0,8075$). Com os pressupostos atendidos, a comparação entre as médias foi realizada pelo teste t de Student com variâncias iguais, resultando em $p = 0,00115$, indicando que a concentração 600 nM é estatisticamente mais eficiente sob as condições estabelecidas.

No mesmo ensaio, foram comparados os valores médios de Cq entre os seis tratamentos de RNA (T1 a T6) em cada concentração de iniciador (Figura 5A). Para 400 nM, as médias variaram entre 26,7 (T5) e 33,5 (T4), enquanto para 600 nM, os valores de Cq variaram entre 23,2 (T5) e 29,4 (T1). O teste Kruskal-Wallis, utilizado como forma exploratória devido à baixa quantidade de réplicas ($n = 1$ por concentração de iniciador) indicou que não havia diferenças entre os tratamentos de RNA (T1 a T6). Os tratamentos controle (TF), nos quais a transcriptase reversa não foi adicionada, não apresentaram curvas de amplificação em nenhuma das concentrações de iniciador, indicando que não havia DNA genômico residual das extrações, assegurando a confiabilidade das análises realizadas.

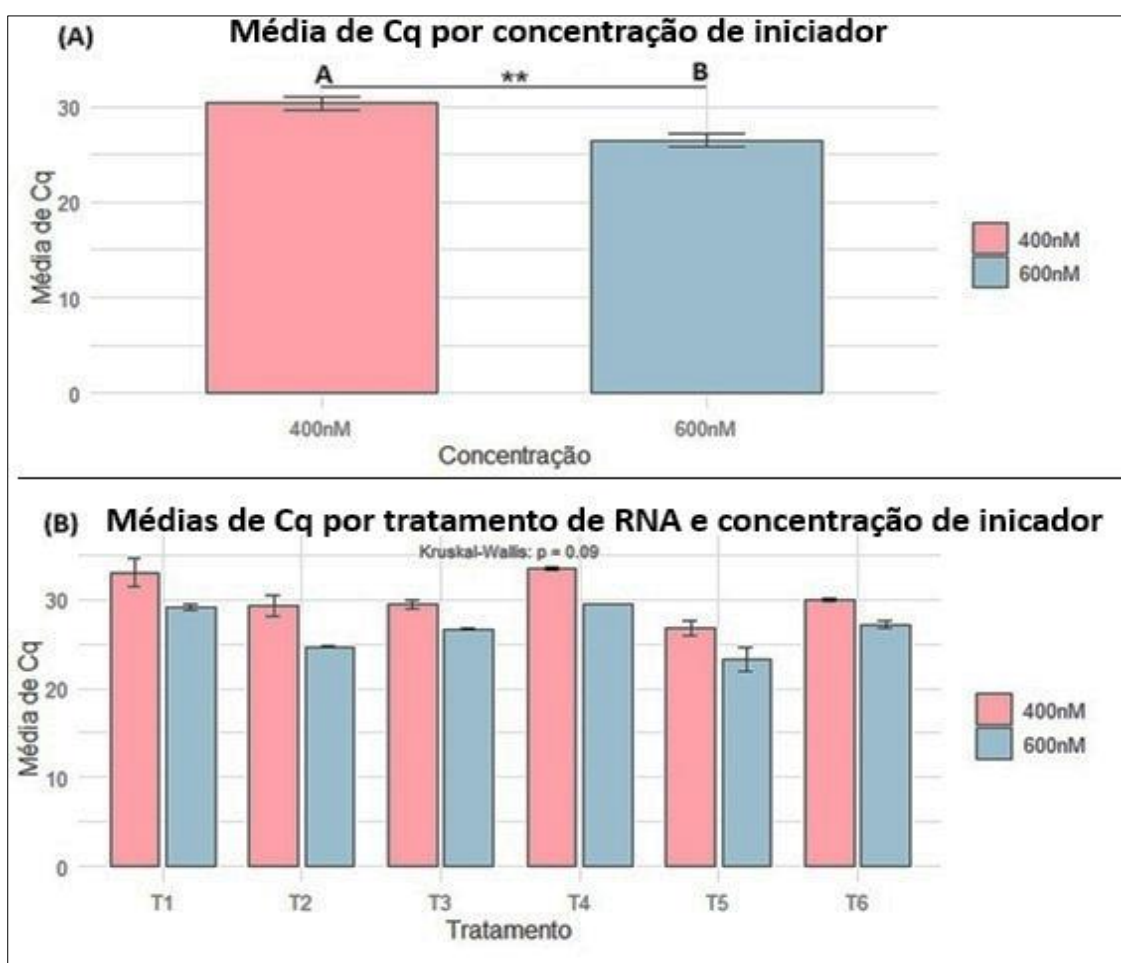


Figura 5 - Comparação dos valores médios de Cq obtidos no ensaio de RT-qPCR para o gene *actina* com diferentes concentrações de iniciadores (A) e entre diferentes tratamentos de RNA (B). (A) Gráfico de barras representando os valores médios de Cq ($\pm$ erro padrão) obtidos para os iniciadores nas concentrações de 400 nM (barra rosa claro) e 600 nM (barra azul claro). A linha com dois asteriscos (**), posicionada entre as barras, indica diferença estatística significativa entre as concentrações segundo o teste t de Student ($p = 0,0012$; $p < 0,01$). (B) Gráfico de barras representando os valores médios de Cq ($\pm$ erro padrão) para os seis tratamentos de RNA (T1 a T6), nas concentrações de 400 nM (rosa claro) e 600 nM (azul claro). O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado separadamente para cada concentração, não revelando diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p = 0,0974$ para 400 nM; $p = 0,0862$ para 600 nM).

5.5 Avaliação da expressão relativa do gene *bZIP60* em *Nicotiana benthamiana* após expressão transiente da proteína P61 do CiLV-C das estirpes CRD e SJP

Os discos foliares de *Nicotiana benthamiana* foram coletados 24 horas após a agroinfiltração com *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 contendo a construção pCAMBIA2300-p35S_IB, destinada à expressão transiente da proteína P61 das estirpes CRD e SJP do CiLV-C, além do vetor vazio (EV), utilizado como controle. A extração de RNA foi realizada conforme o protocolo descrito na seção 4.4 utilizando a concentração de 600 nm de iniciador e tratamento de RNA idêntico ao tratamento T1/T2. Após a verificação da integridade por gel de agarose a 1% e padronização da quantidade de RNA, foi realizada a síntese do cDNA, e por fim amostras foram processadas para a avaliação da expressão relativa do gene *bZIP60*, marcador da via de UPR por RT-qPCR.

A normalização dos valores de Cq foi feita em relação ao gene de referência actina, e os valores de fold-change foram calculados pelo método Pfaffl (Pfaffl, 2001) ajustado por eficiência ($E_{bZIP60} = 1,88$; $E_{actina} = 1,77$). Os valores médios de expressão relativa do gene *bZIP60* foram de $1,00 \pm 0,01$ para o grupo EV, $1,02 \pm 0,02$ para o grupo CRD e $1,08 \pm 0,01$ para o grupo SJP (Figura 6). A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk e todos os tratamentos apresentaram $p > 0,05$. A homogeneidade das variâncias foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$), o que justificou a aplicação da análise de variância (ANOVA). A ANOVA indicou que havia diferenças significativas na expressão relativa de *bZIP60* entre os tratamentos ($p = 0,0045$). As comparações pareadas realizadas pelo teste de Tukey HSD (Honestly Significant Difference) revelaram diferenças na expressão de *bZIP60* após a expressão transiente da proteína P61 da estirpe SJP em relação à CRD ($p = 0,029$) e ao controle EV ($p = 0,005$). Não foi observada diferença significativa entre CRD e EV ($p = 0,755$). Além disso, foram observados fenótipos de morte celular mais intensas nas folhas onde houve a expressão da P61 de CiLV-C_SJP e CRD em relação ao controle EV (Figura 7).

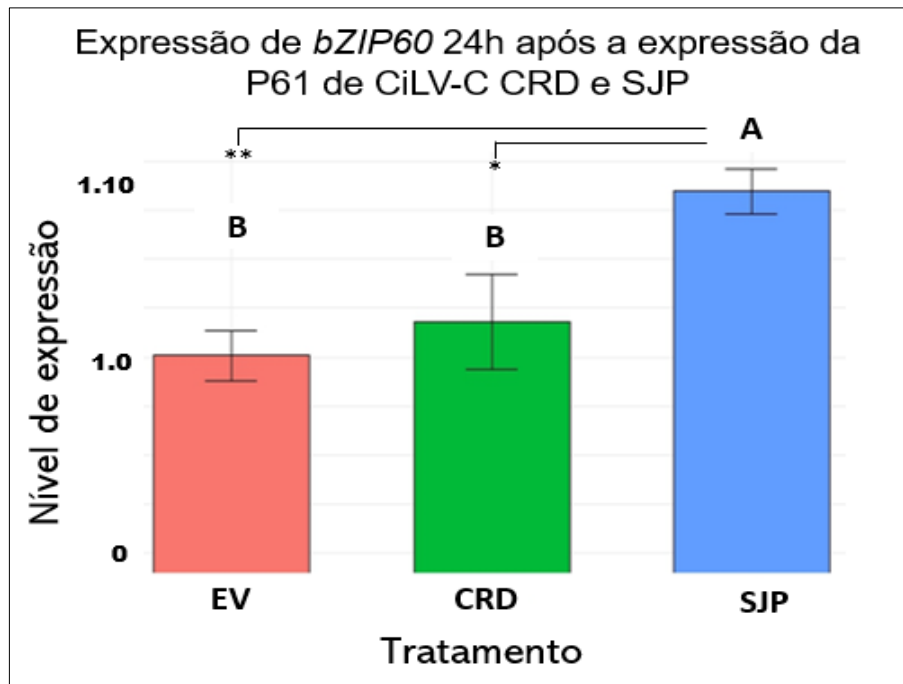


Figura 6 - Gráficos de barras representando a expressão relativa do gene *bZIP60* realizada por RT-qPCR 24 horas após agroinfiltração em *Nicotiana benthamiana* mediante *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 contendo o plasmídeo pCAMBIA 2300 p35S_IB para a expressão transiente da proteína P61 estirpes de CiLV-C SJP, CRD e controle (EV). Os valores representam média $\pm$ desvio padrão ($n = 10$). Resultados normalizados pelo gene actina e analisados pelo método $\Delta\Delta C_q$ ajustado por eficiência pelo método PFAFFL. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos ($p < 0,05$; ANOVA seguida de teste Tukey HSD). (*) representando ($p < 0,05$). (**) representando ($p < 0,001$).



Figura 7 – Sintomatologia de morte celular em folhas de *Nicotiana benthamiana* WT, cinco dias após agroinfiltração na porção superior esquerda das folhas com *Agrobacterium tumefaciens* linhagem AGL-1 portando construções pCAMBIA2300-p35S_IB para expressão transiente da proteína P61 de CiLV-C (estirpes CRD e SJP) e vetor vazio (EV, controle negativo).

6. DISCUSSÃO

Os vírus da família *Kitaviridae* possuem a peculiaridade de produzirem infecções localizadas, sem progressão sistêmica em suas plantas hospedeiras, tanto naturais quanto experimentais, conhecidas (Ramos-González et al., 2023). Essa restrição pode estar associada à ausência de fatores provirais essenciais para a colonização de tecidos sistêmicos ou à possível ativação de respostas imunes locais que impedem a disseminação viral. Sintomas de lesões cloróticas e/ou necróticas, restritas ao redor dos sítios de alimentação dos ácaros vetores do gênero *Brevipalpus*, são características observadas da infecção por esses vírus, e muitas vezes assemelham-se à resposta de hipersensibilidade (HR-like), refletindo a ativação de mecanismos de defesa celular que causam a morte celular (Arena et al., 2020; Freitas-Astúa et al., 2018).

As análises *in silico* realizadas com as proteínas homólogas a P61 de CiLV-C revelaram características estruturais conservadas, para a presença de peptídeo sinal (PS), sítios de N-glicosilação (N-glyc) e domínios transmembrana (DTs), constantemente distribuídos entre os cilevírus e higrevírus. Esses elementos sugerem que as proteínas similares a P61 de CiLV-C opere como uma proteína integrada à membrana e direcionada à via secretora do retículo endoplasmático (RE), com possível inserção em compartimentos endomembranares por meio de seus DTs. Embora não tenha sido predita a presença de PS nas proteínas de CiLV-C2, HYBV e PisV-X, todas as proteínas apresentaram alta probabilidade de localização subcelular no RE. Essa aparente contradição pode ser explicada por limitações do software SignalP 6.0, cujas bases de inteligência artificial (BIAs) são majoritariamente treinadas com estruturas de proteínas de origem animal, o que pode comprometer a acurácia em proteínas virais de plantas. Alternativamente, não pode ser eliminada a hipótese de que possíveis glicoproteínas dos kitavírus que não apresentaram um PS clássico sejam direcionadas ao RE por mecanismos alternativos para a partícula de reconhecimento de sinal (SRP). A SRP pode reconhecer regiões hidrofóbicas, como alfa-hélices na porção N-terminal, por meio de seu domínio hidrofóbico, e posiciona o ribossomo sobre o canal Sec61 do RE, realizando a inserção ou translocação da proteína para o lúmen do RE (Akopian et al., 2013; Hainzl et al., 2011; Hainzl; Elisabeth Sauer-Eriksson, 2015; Keenan et al., 2001)

As análises realizadas pelo software MotifFinder revelaram a presença de domínios funcionais distintos nas proteínas homólogas a P61 de CiLV-C dos kitavírus. A P61 de CiLV-C_CRD e CiLV-C_SJP apresentaram domínios relacionados à interação com RNA — RRM1_hnRPLL (*E-valeu* = 0,44) e Rrp44_S1 (*E-value* = 0,52),

respectivamente. O domínio RRM1 de ribonucleoproteína nuclear heterogênea L-like (hnRNP-LL) é conhecido em humanos por atuar na regulação de splicing alternativo em células T (Oberdoerffer et al., 2008; Topp et al., 2008; Wang et al., 2023b). O domínio Rrp44 é descrito como correspondente ao domínio S1 encontrado no terminal C de ribonucleases como a Rrp44 de levedura, sugerindo possível papel na regulação pós-transcricional ou ligações com RNA, refletindo adaptações evolutivas específicas (Lorentzen et al., 2008; Wang et al., 2023b). A identificação desses domínios sugere que os vírus podem modular processos de RNA no hospedeiro ou vetor, embora os *E-values* intermediários requeiram validação experimental. Adicionalmente, o domínio ALBUMIN_1 (PS00212) foi identificado nas posições C-terminais das proteínas P61 de CiLV-C (CRD/SJP/ASU) e P62 de SvRSV_PRB, indicando possível convergência funcional apesar da baixa conservação de sequência de aminoácidos.

Nos vírus do subgrupo 2, a P62 de SvRSV_PRB também apresentou o domínio FMO GS-OX (*E-value* = 0.15), característico de flavina monooxigenases, indicando uma função enzimática provável (Wang et al., 2023b). A P62 de LigCSV_SPA apresentou o domínio PF19929 (*E-value* = 0.21) classificado como família de função desconhecida (Wang et al., 2023b). Em PisV_Y, foi identificado o domínio fliD (*E* = 0.078), associado à proteína 2 de montagem do gancho flagelar em bactérias (Wang et al., 2023b). O valor de *E-value* sugere fortemente a existência desse domínio, porém mais estudos são necessários para essa confirmação. Os higravírus apresentaram motivos exclusivos, na P66 de PisV-X o domínio major head protein (*E-value* = 0.58), típico de proteínas estruturais de capsídeo de bacteriófagos (Wang et al., 2023b), e o sítio de fosforilação em tirosina em HGSV2. Já a proteína P62 de CiLV-C2_COL e CiLV-C2_HAW não apresentaram nenhum domínio funcional predito, possivelmente devido à baixa conservação de sequência ou ausência nas bases de dados. Além disso, todas as proteínas analisadas apresentaram motivos pós-traducionais comuns, como sítios de N-glicosilação, N-myristoylação e fosforilação por CK2, PKC e cAMP/cGMP-dependente, o que reforça a hipótese de que, independentemente da diversidade, essas proteínas compartilham uma conservação funcional e estrutural relacionada à localização subcelular, ancoragem de membrana e regulação por fosforilação.

Estudos anteriores demonstraram que a proteína P61 de CiLV-C_CRD é capaz de induzir o estresse do RE, ativar a UPR, causar PCD (Arena et al., 2020). Além disso, alterações fisiológicas semelhantes foram observadas durante infecções experimentais com ácaros virulíferos contendo o CiLV-C_SJP, indicando que a P61 representa um componente fundamental da resposta fisiopatológica induzida pelo vírus, uma vez que a

deleção da sua porção N-terminal, codificante para o PS, diminui significativamente a indução da UPR e PCD (Arena et al., 2020; Arena, dados não publicados). Estudos com o PVX e a expressão transiente de sua proteína de movimento TGBp3, envolvida na formação do complexo de replicação viral, demonstraram que expressão isolada da TGB3 ativa a UPR pela indução da expressão de bZIP60, o que favorece a replicação viral e a disseminação sistêmica (Ye et al., 2013, 2011; Ye; Verchot, 2011). Além disso, foi demonstrado que TBG3 é responsável por induzir a PCD, e os efeitos causados são semelhantes a infecções pelo vírus. Por outro lado, o silenciamento quase completo do gene bZIP60 por meio de RNAs de fita dupla (dsRNA) em protoplastos resultou na drástica redução da replicação viral. Em plantas de *N. benthamiana*, o uso do sistema de silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) para reduzir a expressão de bZIP60, embora menos eficiente que o dsRNA, também foi capaz de diminuir significativamente o acúmulo e a disseminação do PVX. Esses achados reforçam que bZIP60 é um fator essencial do hospedeiro para a replicação de outros vírus como o PVX e que a eliminação quase total desse gene é suficiente para impedir a replicação viral (Ye et al., 2013; Ye; Verchot, 2011).

Através dos ensaios de expressão transiente das proteínas P61 das estirpes CRD e SJP de CiLV-C, foi observado que a P61 da estirpe SJP também é capaz de induzir a UPR em 24 horas após a agroinfiltração (Figura 6) e a morte celular do tecido foliar em 5 dias após a infiltração (Figura 7). Esse resultado coopera com a hipótese de que a P61 seja a efetora da patogênese causada pelo CiLV-C ao incitar a via da UPR (Arena et al., 2020; Ramos-González et al., 2023). A ativação precoce da UPR pela proteína P61 de CiLV-C_SJP, em comparação com a estirpe CRD, pode refletir a maior capacidade replicativa do CiLV-C_SJP, possivelmente associada à indução antecipada da UPR. No entanto, essa ativação rápida da resposta pode levar a um esgotamento precoce da capacidade celular de lidar com o estresse, resultando em uma PCD mais rápida e intensa como resposta de defesa celular (Arena et al., 2020; Potsclam, 2022; Ramos-González et al., 2023).

Embora estudos anteriores tenham relatado uma elevada expressão do gene bZIP60 em resposta à proteína P61 de CiLV-C_CRD (Arena et al., 2020), é importante considerar as diferenças metodológicas entre os trabalhos. Naquele estudo, a expressão da P61 de CiLV-C_CRD foi regulada por um promotor induzível por dexametasona, com a indução realizada 24 horas após a agroinfiltração e a coleta do tecido ocorrendo 24 horas após essa indução, totalizando 48 horas após a agroinfiltração. Esse sistema permitiu maior controle sobre o início da expressão da proteína, favorecendo a detecção de respostas celulares específicas. No presente estudo, foi utilizado um promotor constitutivo 35S de CaMV,

que conduz à expressão contínua das proteínas P61 desde o momento da infiltração. Essa diferença pode ter resultado em uma indução menos pronunciada do gene *bZIP60* nas primeiras 24 horas, uma vez que a resposta celular pode ocorrer de forma mais distribuída ao longo do tempo. Além disso, os iniciadores utilizados para a detecção por qPCR dos genes *bZIP60* e *actina* apresentaram eficiências abaixo do ideal, o que pode ter limitado a precisão dos dados. Portanto, é necessária a repetição dos ensaios, abrangendo diferentes tempos pós-infiltração para melhor avaliar a dinâmica da expressão do *bZIP60*, além de otimizar a eficiência da qPCR, com possível ajuste ou substituição dos primers.

Os resultados deste trabalho sugerem que as proteínas homólogas a P61 de CiLV-C_CRD possam estar envolvidas na interação indireta com o ácaro vetor. A infecção por CiLV-C e a expressão da proteína P61 isoladamente causam efeitos semelhantes nas alterações das vias hormonais da planta, promovendo a via do AS e reprimindo a do JA, o que causa a redução das defesas contra herbivoria (Arena et al., 2020). As lesões necróticas salientes criadas pela infecção proporcionam microambientes ideais para a oviposição e permanência do ácaro vetor, servindo como barreiras físicas protetoras e atrativos comportamentais (Kapp et al., 2024). Esse padrão de manipulação foi observado para outros vírus transmitidos por vetores, como turnip mosaic virus (TuMV, *Potyvirus rapae*), que altera a emissão de voláteis e a fisiologia da planta para favorecer a aquisição viral pelo vetor (Casteel et al., 2015; Paris et al., 2024). Portanto, é sugerido que a proteína P61 de CiLV-C, além de possuir papel de modulador de mecanismo celular da planta hospedeira, também atue nas interações com o vetor, tanto indiretamente para favorecer a colonização do vetor e aquisição do vírus, quanto na possível estabilização de RNA viral ou adesão a superfícies celulares.

De forma geral, a P61 aparenta atuar como uma proteína multifuncional com função estrutural e reguladora. Na planta hospedeira, influencia vias hormonais e respostas de estresse, especialmente via UPR, modulando a defesa e contribuindo para o padrão de sintomas. No vetor, pode facilitar a persistência viral e promover a eficiência da transmissão. O conjunto de características estruturais conservadas nas possíveis glicoproteínas dos kitavírus — PS, DT, N-glyc, motivos de fosforilação e domínios funcionais — colaboram com a hipótese de que essas proteínas constituem determinantes moleculares essenciais para a patogênese e adaptação dos membros da família *Kitaviridae* às interações entre vírus, planta e vetor.

7. CONCLUSÕES

- (i) As ORFs e proteínas homólogas a P61 de CiLV-C dos kitavírus possuem baixa identidade entre elas, porém, as proteínas apresentam alta conservação de características estruturais de peptídeo sinal, domínios transmembrana e sítio de N-glicosilação, além da possível localização subcelular no retículo endoplasmático.
- (ii) As proteínas P61 de CiLV-C estirpe CRD e SJP apresentam motivos distintos, porém ambos relacionados a ligação e processamento de RNA.
- (iii) A proteína P61 de CiLV-C estirpe SJP é capaz de aumentar os níveis de expressão do gene *bZIP60*, marcador da via de UPR, além de causar morte celular semelhante àquela observada para a proteína P61 de CiLV-C estirpe CRD.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, B.; VERCHOT, J.; BRANDIZZI, F.; KO, D. K. ER Stress and Viral Defense: Advances and Future Perspectives on Plant Unfolded Protein Response in Pathogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 0, n. 0, p. 108354, fev. 2025.

AKOPIAN, D.; SHEN, K.; ZHANG, X.; SHAN, S. O. Signal recognition particle: an essential protein-targeting machine. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, p. 693–721, 13 fev. 2013.

ALAZEM, M.; LIN, N. S. Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 5, p. 529–540, 2015.

ALFARO-VALDÉS, H. M.; BURGOS-BRAVO, F.; CASANOVA-MORALES, N.; QUIROGA-ROGER, D.; WILSON, C. A. M.; ALFARO-VALDÉS, H. M.; BURGOS-BRAVO, F.; CASANOVA-MORALES, N.; QUIROGA-ROGER, D.; WILSON, C. A. M. Mechanical Properties of Chaperone BiP, the Master Regulator of the Endoplasmic Reticulum. **IntechOpen**, 2018.

AN, C.; MOU, Z. Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, n. 6, p. 412–428, 2011.

ARENA, G. D. D.; BERGAMINI, M. P. P.; TASSI, A. D. D.; KITAJIMA, E. W. W.; KUBO, K. S. S.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus Leprosis Virus C Infects Arabidopsis Thaliana, the Model for Plant-Pathogen Interactions. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n. 2, p. 448, 2013.

ARENA, G. D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; FALK, B. W.; CASTEEL, C. L.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M. A. 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**, v. 11, n. August, p. 1–20, 7 ago. 2020.

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. Arabidopsis thaliana as a model host for Brevipalpus mite-transmitted viruses. *Scientia Agricola*, v. 74, n. 1, p. 85–89, fev. 2016a.

ARENA, G. D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; NUNES, M. A.; RIBEIRO-ALVES, M.; CAMARGO, L. E. A. E. A.; KITAJIMA, E. W.; MACHADO, M. A.; FREITAS-ASTÚA, J. 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**, v. 7, n. NOVEMBER2016, p. 1757, 2016b.

AVIJIT ROY, JONATHAN SHAO, JOHN S HARTUNG, W. S. and R. B. A Case Study on Discovery of Novel Citrus Leprosis Virus Cytoplasmic Type 2 Utilizing Small RNA Libraries by Next Generation Sequencing and Bioinformatic Analyses. **Journal of Datamining in Genomics & Proteomics**, v. 4, n. 2, 2013.

BANERJEE, N.; MUKHOPADHYAY, S. Viral glycoproteins: biological role and application in diagnosis. **Virus Disease**, v. 27, n. 1, p. 1, 1 mar. 2016.

BAO, Y.; BASSHAM, D. C.; HOWELL, S. H. A functional unfolded protein response is required for normal vegetative development. **Plant Physiology**, v. 179, n. 4, p. 1834–1843, 2019.

BAO, Y.; HOWELL, S. H. The unfolded protein response supports plant development and defense as well as responses to abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. March, p. 1–6, 2017.

BAO, Y.; PU, Y.; YU, X.; GREGORY, B. D.; SRIVASTAVA, R.; HOWELL, S. H.; BASSHAM, D. C. IRE1B degrades RNAs encoding proteins that interfere with the induction of autophagy by ER stress in *Arabidopsis thaliana*. **Autophagy**, v. 14, n. 9, p. 1562–1573, 2018.

BASSANEZI, R. B. Leprose dos citros. **Fundecitrus**, p. 20, 2017.

BAULCOMBE, D. Induction of systemic GFP gene silencing by *Agrobacterium*. Apollo - **University of Cambridge Repository**, 2019.

BENHAM, A. M. Endoplasmic Reticulum redox pathways: in sickness and in health. **FEBS Journal**, v. 286, 2019.

BIRNBOIM, H. C. A Rapid Alkaline Extraction Method for the Isolation of Plasmid DNA. [s.l.] **Academic Press, Inc.**, 1989. v. 169175–187 p.

CASTEEL, C. L.; DE ALWIS, M.; BAK, A.; DONG, H.; WHITHAM, S. A.; JANDER, G. Disruption of ethylene responses by Turnip mosaic virus mediates suppression of plant defense against the green peach aphid vector. **Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 209–218, 2015.

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. Molecular Epidemiology of Citrus Leprosis Virus C: A New Viral Lineage and Phylodynamic of the Main Viral Subpopulations in the Americas. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. April, 2021.

CHEN, Y.; BRANDIZZI, F. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 11, p. 547–555, 2013.

DENG, Y.; HUMBERT, S.; LIU, J. X.; SRIVASTAVA, R.; ROTHSTEIN, S. J.; HOWELL, S. H. Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 17, p. 7247–7252, 2011.

DENG, Y.; SRIVASTAVA, R.; HOWELL, S. H. Protein kinase and ribonuclease domains of IRE1 confer stress tolerance, vegetative growth, and reproductive development in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 48, p. 19633–19638, 2013.

FREITAS-ASTÚA, J.; RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; ARENA, G. D.; TASSI, A. D.; KITAJIMA, E. W. Brevipalpus-transmitted viruses: parallelism beyond a common vector or convergent evolution of distantly related pathogens? **Current Opinion in Virology**, v. 33, p. 66–73, 1 dez. 2018.

GARCIA-RUIZ, H. Host factors against plant viruses. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 11, p. 1588–1601, 2019.

GAYRAL, M.; ARIAS GAGUANCELA, O.; VASQUEZ, E.; HERATH, V.; FLORES, F. J.; DICKMAN, M. B.; VERCHOT, J. Multiple ER-to-nucleus stress signaling pathways are activated during *Plantago asiatica* mosaic virus and Turnip mosaic virus infection in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 103, n. 3, p. 1233–1245, 2020.

GHANTA, S.; BHATTACHARYYA, D.; SINHA, R.; BANERJEE, A.; CHATTOPADHYAY, S. *Nicotiana tabacum* overexpressing γ -ECS exhibits biotic stress tolerance likely through NPR1-dependent salicylic acid-mediated pathway. **Plant**, v. 233, n. 5, p. 895–910, 2011.

GOMAA, A. E.; EL MOUNADI, K.; PARPERIDES, E.; GARCIA-RUIZ, H. Cell Fractionation and the Identification of Host Proteins Involved in Plant–Virus Interactions. **Pathogens**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2024.

GRANGEON, R.; AGBECI, M.; CHEN, J.; GRONDIN, G.; ZHENG, H.; LALIBERTÉ, J.-F. Impact on the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus of Turnip Mosaic Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 86, n. 17, p. 9255–9265, 2012.

GUPTA, R.; BRUNAK, S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. **Pacific Symposium on Biocomputing** 7:310-322, 2002.

HAINZL, T.; ELISABETH SAUER-ERIKSSON, A. Signal-sequence induced conformational changes in the signal recognition particle. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1–7, 8 jun. 2015.

HAINZL, T.; HUANG, S.; MERILÄINEN, G.; BRÄNNSTRÖM, K.; SAUER-ERIKSSON, A. E. Structural basis of signal-sequence recognition by the signal recognition particle. **Nature structural & molecular biology**, v. 18, n. 3, p. 389–391, mar. 2011.

HASANUZZAMAN, M.; BORHANNUDDIN BHUYAN, M. H. M.; ANEE, T. I.; PARVIN, K.; NAHAR, K.; AL MAHMUD, J.; FUJITA, M. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, 1 set. 2019.

HEINLEIN, M. Plant virus replication and movement. **Virology**, v. 479–480, p. 657–671, 2015.

HELENIUS, A.; AEBI, M. ROLE OF N-LINKED GLYCANS IN THE ER. **Annual Review of Biochemistry**, 2004.

HERATH, V.; CONNOLLY, K.; ROACH, A.; AUSEKAR, A.; PERSKY, T.; VERCHOT, J.; CONNOLLY, K.; VERCHOT, J.; ROACH, A. The plant endoplasmic reticulum UPRome: A repository and pathway browser for genes involved in signaling networks linked to the endoplasmic reticulum. **Plant Direct**, v. 6, n. 7, p. 1–7, 2022.

HERATH, V.; GAYRAL, M.; MILLER, R. K.; VERCHOT, J. BIP and the unfolded protein response are important for potyvirus and potexvirus infection. **Plant Signaling and Behavior**, v. 15, n. 11, 2020.

HETZ, C.; PAPA, F. R. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. **Molecular Cell**, v. 69, n. 2, p. 169–181, 2018.

HOLLIEN J; WEISSMANN JS. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. **Science**, v. 313, n. 5783, p. 101–104, 2006.

HOWELL, S. H. Endoplasmic reticulum stress responses in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 477–499, 2013.

HOWELL, S. H. When is the unfolded protein response not the unfolded protein response? **Plant Science**, v. 260, n. April, p. 139–143, 2017.

HYODO, K.; KAIDO, M.; OKUNO, T. Host and viral RNA-binding proteins involved in membrane targeting, replication and intercellular movement of plant RNA virus genomes. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. JUL, p. 1–7, 2014.

JONES, J.D.G., Dangl. J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.

KAPP, A. B. P.; VECCHIA, J. F. Della; SINICO, T. E.; BASSANEZI, R. B.; RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANDRADE, D. J. Brevipalpus yothersi Baker (Tenuipalpidae) development in sweet orange plants is influenced by previous mite infestation and the presence of shelters. **Experimental and Applied Acarology**, v. 92, n. 4, p. 759–775, 2024.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.

KAYA, C.; ASHRAF, M.; ALYEMENI, M. N.; AHMAD, P. The role of endogenous nitric oxide in salicylic acid-induced up-regulation of ascorbate-glutathione cycle involved in salinity tolerance of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 147, p. 10–20, 1 fev. 2020.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.

KEENAN, R. J.; FREYMAN, D. M.; STROUD, R. M.; WALTER, P. The signal recognition particle. **Annual review of biochemistry**, v. 70, p. 755–775, 2001.

KELLEHER, D. J.; GILMORE, R. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. **Glycobiology**, v. 16, n. 4, abr. 2006.

KHAN, M. I. R.; POOR, P.; JANDA, T. Salicylic Acid: A Versatile Signaling Molecule in Plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 41, n. 5, p. 1887–1890, 1 jul. 2022.

KONDO, H.; FUJITA, M.; HISANO, H.; HYODO, K.; ANDIKA, I. B.; SUZUKI, N. Virome Analysis of Aphid Populations That Infest the Barley Field: The Discovery of Two Novel Groups of Nege/Kita-Like Viruses and Other Novel RNA Viruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. April, p. 1–19, 2020.

KOONIN, E. V.; DOLJA, V. V.; KRUPOVIC, M.; VARSANI, A.; WOLF, Y. I.; YUTIN, N.; ZERBINI, F. M.; KUHN, J. H. Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 2, p. 1–33, 2020.

KOZAK, M. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. **Gene**, v. 299, n. 1–2, p. 1–34, 2002.

LEASTRO, M. O.; CASTRO, D. Y. O.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E. W.; PALLÁS, V.; SÁNCHEZ-NAVARRO, J. Á. Citrus Leprosis Virus C Encodes Three Proteins With Gene Silencing Suppression Activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. June, p. 1–16, 2020.

LEASTRO, M. O.; KITAJIMA, E. W.; SILVA, M. S.; RESENDE, R. O.; FREITAS-ASTÚA, J. Dissecting the subcellular localization, intracellular trafficking, interactions, membrane association, and topology of citrus leprosis virus c proteins. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1299, 11 set. 2018.

LELLIS, A. D.; KASSCHAU, K. D.; WHITHAM, S. A.; CARRINGTON, J. C. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. **Current Biology**, v. 12, n. 12, p. 1046–1051, 2002.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: Recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. W1, p. W78–W82, 2024.

LI, C.; XU, Y.; FU, S.; LIU, Y.; LI, Z.; ZHANG, T.; WU, J.; ZHOU, X. The unfolded protein response plays dual roles in rice stripe virus infection through finetuning the movement protein accumulation. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 3, p. 1–26, 2021.

LI, F. F.; SUN, H. J.; JIAO, Y. B.; WANG, F. L.; YANG, J. G.; SHEN, L. L. Viral infection-induced endoplasmic reticulum stress and a membrane-associated transcription factor NbNAC089 are involved in resistance to virus in *Nicotiana benthamiana*. **Plant Pathology**, v. 67, n. 1, p. 233–243, 2018.

LI, F.; WANG, A. RNA-Targeted Antiviral Immunity: More Than Just RNA Silencing. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 9, p. 792–805, 2019.

LISOWSKA, E. Protein Glycosylation. **Encyclopedia Of Life Science**, 2006

LIU, J. X.; HOWELL, S. H. Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. **Plant Cell**, v. 22, n. 9, p. 2930–2942, 2010a.

LIU, J. X.; HOWELL, S. H. bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 22, n. 3, p. 782–796, 2010b.

LIU, J. X.; HOWELL, S. H. Managing the protein folding demands in the endoplasmic reticulum of plants. **The New phytologist**, v. 211, n. 2, p. 418–428, 2016.

LIU, J. X.; SRIVASTAVA, R.; CHE, P.; HOWELL, S. H. An endoplasmic reticulum stress response in *Arabidopsis* is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28. **Plant Cell**, v. 19, n. 12, p. 4111–4119, 2007.

LIU, Z.; LV, Y.; ZHAO, N.; GUAN, G.; WANG, J. Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate. **Cell Death and Disease**, 2015.

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. P. N.; MACHADO, M. A. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of citrus leprosis virus cytoplasmic type. **The Journal of general virology**, v. 87, n. Pt 9, p. 2721–9, set. 2006.

MALAMY, J.; CARR, J. P.; KLESSIG, D. F.; RASKIN, I. Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. **Science**, v. 250, n. 4983, p. 1002–1004, 1990.

MANDADI, K. K.; SCHOLTHOF, K. B. G. Plant immune responses against viruses: How does a virus cause disease? **Plant Cell**, v. 25, n. 5, p. 1489–1505, 2013.

MANGHWAR, H.; LI, J. Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response Signaling in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, 2022.

MISHIBA, K. I.; IWATA, Y.; MOCHIZUKI, T.; MATSUMURA, A.; NISHIOKA, N.; HIRATA, R.; KOIZUMI, N. Unfolded protein-independent IRE1 activation contributes to multifaceted developmental processes in Arabidopsis. **Life Science Alliance**, v. 2, n. 5, p. 1–12, 2019.

MOHAMMADI, M.; HOSSEINI, A.; NASROLLANEJAD, S. In silico identification of two novel viruses on Iranian pistachio. **Iranian Journal of Plant Pathology**, v. 57, n. 1, p. 81–85, 2021.

MOREIRA. A safra de laranja 2022 / 23 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo / Sudoeste Mineiro. **FUNDECITRUS**, p. 25–28, 2023.

MOREMEN, K. W.; TIEMEYER, M.; NAIRN, A. V. Vertebrate protein glycosylation: Diversity, synthesis and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 7, p. 448–462, jul. 2012.

MUSIDLAK, O.; NAWROT, R.; GOŹDZICKA-JÓZEFIK, A. 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**, v. 18, n. 11, 2017.

NAGARAJAN, N.; NG, P.; KEICH, U. Refining Motif finder With E-Value calculations. **The University of Sydney** p. 73–84, jul. 2008.

NAGASHIMA, Y.; MISHIBA, K. I.; SUZUKI, E.; SHIMADA, Y.; IWATA, Y.; KOIZUMI, N. Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. **Scientific Reports**, v. 1, 2011.

NAWKAR, G. M.; LEE, E. S.; SHELAK, R. M.; PARK, J. H.; RYU, S. W.; KANG, C. H.; LEE, S. Y. Activation of the transducers of unfolded protein response in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. February, p. 1–10, 2018.

NIELSEN, H.; TEUFEL, F.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. SignalP: The Evolution of a Web Server. *Em: Methods in Molecular Biology*. [s.l.] **Humana Press Inc.**, 2024. p. 331–367.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; CHAOUCH, S.; HAN, Y.; NEUKERMANS, J.; MARQUEZ-GARCIA, B.; QUEVAL, G.; FOYER, C. H. Glutathione in plants: An integrated overview. **Plant, Cell and Environment**, v. 35, n. 2, p. 454–484, fev. 2012.

OBERDOERFFER, S.; MOITA, L. F.; NEEMS, D.; FREITAS, R. P.; HACHEN, N.; RAO, A. Regulation of CD45 alternative splicing by heterogeneous ribonucleoprotein, hnRNPL. **Science**, v. 321, n. 5889, p. 686–691, 1 ago. 2008.

ØDUM, M. T.; TEUFEL, F.; THUMULURI, V.; ARMENTEROS, J. J. A.; JOHANSEN, A. R.; WINTHER, O.; NIELSEN, H. DeepLoc 2.1: multi-label membrane protein type prediction using protein language models. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. W1, p. W215–W220, jul. 2024.

OIKAWA, D.; KIMATA, Y.; KOHNO, K.; IWAWAKI, T. Activation of mammalian IRE1 α upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. **Experimental Cell Research**, v. 315, n. 15, p. 2496–2504, 2009.

OLMEDO-VELARDE, A.; HU, J.; MELZER, M. J. A Virus Infecting Hibiscus rosa-sinensis Represents an Evolutionary Link Between Cileviruses and Higreviruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. May, p. 1–13, 2021.

OÑATE-SÁNCHEZ, L.; VICENTE-CARBAJOSA, J. DNA-free RNA isolation protocols for Arabidopsis thaliana, including seeds and siliques. **BMC Research Notes**, v. 1, p. 1–7, 2008.

ORR, H. A.; COYNE, J. A.; MACKAY, T. F. C.; JACKSON, I. J.; SUMNER, F. B.; BOWEN, W. W.; DAWSON, W. D.; BELK, M. C.; SMITH, M. H.; KAUFMAN, D. W.; WOOTEN, M. C.; HOEKSTRA, H. E.; NEWTON, C.; MARSHALL, H. D.; HAWKINS, K.; BIRMINGHAM, E.; RICKLEFS, R. E.; MUNDY, N. I.; MULLEN, L.; TURNER, L.; PARKINSON, C.; SUAZO, A.; HOFREITER, M.; KOHN, J.; PEICHEL, K.; PRICE, T.; ROEMPLER, H.; STINCHCOMBE, J. Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response. **Science**, n. July, p. 104–107, 2006.

PARIS, T. M.; JOHNSTON, N.; STRZYZEWSKI, I.; GRIESHEIMER, J. L.; REIMER, B.; MALFA, K.; ALLAN, S. A.; MARTINI, X. Tomato yellow leaf curl virus manipulates Bemisia tabaci, MEAM1 both directly and indirectly through changes in visual and volatile cues. **PeerJ**, v. 12, n. 7, p. 1–23, 2024.

PARK, C. J.; PARK, J. M. Endoplasmic reticulum plays a critical role in integrating signals generated by both biotic and abiotic stress in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 22 mar. 2019. . Acesso em: 16 mar. 2025.

PASTOR-CANTIZANO, N.; KO, D. K.; ANGELOS, E.; PU, Y.; BRANDIZZI, F. Functional Diversification of ER Stress Responses in Arabidopsis. **Trends in Biochemical Sciences Elsevier Inc.**, 2020.

PEÑA, J.; HARRIS, E. Dengue virus modulates the unfolded protein response in a time-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 16, p. 14226–14236, 2011.

PERERA, N.; MILLER, J. L.; ZITZMANN, N. The role of the unfolded protein response in dengue virus pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 1–9, 2017.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45–e45, 1 maio 2001.

PINCUS, D.; CHEVALIER, M. W.; ARAGÓN, T.; VAN ANKEN, E.; VIDAL, S. E.; EL-SAMAD, H.; WALTER, P. BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. **PLoS Biology**, v. 8, n. 7, 2010.

POLLARI, M.; DE, S.; WANG, A.; MÄKINEN, K. The potyviral silencing suppressor HCPro recruits and employs host ARGONAUTE1 in pro-viral functions. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 10, 2020.

POÓR, P.; CZÉKUS, Z.; TARI, I.; ÖRDÖG, A. The multifaceted roles of plant hormone salicylic acid in endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, 2019.

POTSCLAM, M. Carga viral das estirpes de Citrus leprosis virus C e seu potencial impacto na epidemiologia da leprose dos citros. **Repositório Instituto Biológico de São Paulo**, 2022.

PRASAD, V.; GREBER, U. F. The endoplasmic reticulum unfolded protein response-homeostasis, cell death and evolution in virus infections. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 5, p. 1–19, 2021.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical. <https://www.r-project.org/>, 2021.

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. Phylogenetic and Molecular Variability Studies Reveal a New Genetic Clade of Citrus Leprosis Virus C. **Viruses**, v. 8, n. 6, p. 1–25, 6 jan. 2016.

RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; CHABI-JESUS, C.; TASSI, A. D.; CALEGARIO, R. F.; HARAKAVA, R.; NOME, C. F.; KITAJIMA, E. W.; FREITAS-ASTUA, J. A Novel Lineage of Cile-Like Viruses Discloses the Phylogenetic Continuum Across the Family Kitaviridae. **Frontiers in Microbiology**, v. 0, p. 682, 28 mar. 2022.

RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; DIAS ARENA, G.; TASSI, A. D.; CHABI-JESUS, C.; WATANABE KITAJIMA, E.; FREITAS-ASTÚA, J. Kitaviruses: A Window to Atypical Plant Viruses Causing Nonsystemic Diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 61, p. 97–118, 2023.

RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; SANTOS, G. F. dos; CHABI-JESUS, C.; HARAKAVA, R.; KITAJIMA, E. W.; FREITAS-ASTÚA, J. 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**, v. 11, n. February, p. 206, 14 fev. 2020.

RODRIGUEZ-PEÑA, R.; MOUNADI, K. El; GARCIA-RUIZ, H. Changes in subcellular localization of host proteins induced by plant viruses. **Viruses**, v. 13, n. 4, p. 1–22, 2021.

ROTH, J. Protein N-glycosylation along the Secretory Pathway: Relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 2, p. 285–303, fev. 2002.

RYEN, T.; KJOSMOEN, T.; RYEN, T.; EFTESTØL, T. Exploring the combinatorics of motif alignments for accurately computing E-values from p-values. **World Academy of Science**, 2014.

SALEEM, M.; FARIDUDDIN, Q.; CASTROVERDE, C. D. M. Salicylic acid: A key regulator of redox signalling and plant immunity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 168, p. 381–397, 1 nov. 2021.

SANCHEZ, A. J.; VINCENT, M. J.; NICHOL, S. T. Characterization of the Glycoproteins of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. **Journal of Virology**, v. 76, n. 14, p. 7263, 15 jul. 2002

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R. J. The mammalian unfolded protein response. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, p. 739–789, 2005.

SCHWARZ, D. S.; BLOWER, M. D. The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 1, p. 79–94, 2016.

SOLOVYEV, A. G.; ATABEKOVA, A. K.; LEZZHOV, A. A.; SOLOVIEVA, A. D.; CHERGINTSEV, D. A.; MOROZOV, S. Y. Distinct Mechanisms of Endomembrane Reorganization Determine Dissimilar Transport Pathways in Plant RNA Viruses. **Plants**, v. 11, n. 18, 2022.

SONNHAMMER, E. L. L.; VON HEIJNE, G.; KROGH, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. **Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol**, 1998.

SPETZ, C.; VALKONEN, J. P. T. Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, p. 502–510, 2004.

SPIRO, R. G. Protein glycosylation: Nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, v. 12, n. 4, 2002.

SRIVASTAVA, R.; DENG, Y.; HOWELL, S. H. Stress sensing in plants by an ER stress sensor/transducer, bZIP28. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. FEB, p. 1–6, 2014.

SRIVASTAVA, R.; LI, Z.; RUSSO, G.; TANG, J.; BI, R.; MUPPIRALA, U.; CHUDALAYANDI, S.; SEVERIN, A.; HE, M.; VAITKEVICIUS, S. I.; LAWRENCE-DILL, C. J.; LIU, P.; STAPLETON, A. E.; BASSHAM, D. C.; BRANDIZZI, F.; HOWELL, S. H. Response to persistent er stress in plants: A multiphasic process that transitions cells from prosurvival activities to cell death. **Plant Cell**, v. 30, n. 6, p. 1220–1242, 2018.

STANLEY, P. N-Glycans. *Em: Encyclopedia of Cell Biology: Volume 1-6, Second Edition*. [s.l.] **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2022. p. 487–494.

STRASSER, R. Plant protein glycosylation. [s.l.] **Oxford University Press**, 2016. v. 26926–939 p.

STRASSER, R. Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum of Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 69, p. 147–172, 29 abr. 2018.

SUN, L.; LU, S. J.; ZHANG, S. S.; ZHOU, S. F.; SUN, L.; LIU, J. X. The lumen-facing domain is important for the biological function and organelle-to-organelle movement of BZIP28 during ER stress in arabidopsis. **Molecular Plant**, v. 6, n. 5, p. 1605–1615, 2013a.

SUN, L.; YANG, Z. T.; SONG, Z. T.; WANG, M. J.; SUN, L.; LU, S. J.; LIU, J. X. The plant-specific transcription factor gene NAC103 is induced by bZIP60 through a new cis-regulatory element to modulate the unfolded protein response in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 76, n. 2, p. 274–286, 2013b.

TARI, I.; CSISZÁR, J.; HORVÁTH, E.; POÓR, P.; TAKÁCS, Z.; SZEPE, A. The alleviation of the adverse effects of salt stress in the tomato plant by salicylic acid shows a time and organ-specific antioxidant response. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 57, n. 1, p. 21–30, 1 jun. 2015.

TOPP, J. D.; JACKSON, J.; MELTON, A. A.; LYNCH, K. W. A cell-based screen for splicing regulators identifies hnRNP LL as a distinct signal-induced repressor of CD45 variable exon 4. **RNA**, v. 14, n. 10, p. 2038–2049, 1 out. 2008.

TRIFINOPOULOS, J.; NGUYEN, L. T.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W232–W235, 2016.

UNTERGASSER, A.; RUIJTER, J. M.; BENES, V.; VAN DEN HOFF, M. J. B. Web-based LinRegPCR: application for the visualization and analysis of (RT)-qPCR amplification and melting data. **BMC Bioinformatics**, v. 22, n. 1, p. 1–18, 1 dez. 2021.

VERCHOT, J. Wrapping membranes around plant virus infection. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 5, p. 388–395, 2011.

VITALE, M.; BAKUNTS, A.; ORSI, A.; LARI, F.; TADÉ, L.; DANIELI, A.; RATO, C.; VALETTI, C.; SITIA, R.; RAIMONDI, A.; CHRISTIANSON, J. C.; VAN ANKEN, E. Inadequate BiP availability defines endoplasmic reticulum stress. **eLife**, v. 8, p. 1–17, 2019.

VON HELJNE, G. Life and death of a signal peptide. **Nature**, v. 396, n. 6707, p. 111–113, 1998.

WAHL-JENSEN, V.; KURZ, S. K.; HAZELTON, P. R.; SCHNITTLER, H.-J.; STRÖHER, U.; BURTON, D. R.; FELDMANN, H. Role of Ebola Virus Secreted Glycoproteins and Virus-Like Particles in Activation of Human Macrophages. **Journal of Virology**, v. 79, n. 4, p. 2413–2419, 15 fev. 2005.

WANG, D.; WEI, L.; LIU, T.; MA, J.; HUANG, K.; GUO, H.; HUANG, Y.; ZHANG, L.; ZHAO, J.; TSUDA, K.; WANG, Y. Suppression of ETI by PTI priming to balance plant growth and defense through an MPK3/MPK6-WRKYs-PP2Cs module. **Molecular Plant**, v. 16, n. 5, p. 903–918, 2023a.

WANG, J.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; GONZALES, N. R.; GWADZ, M.; LU, S.; MARCHLER, G. H.; SONG, J. S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R. A.; YANG, M.; ZHANG, D.; ZHENG, C.; LANCZYCKI, C. J.; MARCHLER-BAUER, A. The conserved domain database in 2023. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D384–D388, 2023b.

WESTRATE, L. M.; LEE, J. E.; PRINZ, W. A.; VOELTZ, G. K. Form follows function: The importance of endoplasmic reticulum shape. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, p. 791–811, 2015.

XIA, X. J.; ZHOU, Y. H.; SHI, K.; ZHOU, J.; FOYER, C. H.; YU, J. Q. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 10, p. 2839–2856, 2015.

YANG, X.; TIAN, Y.; ZHAO, X.; JIANG, L.; CHEN, Y.; HU, S.; MACFARLANE, S.; CHEN, J.; LU, Y.; YAN, F. NbALY916 is involved in potato virus X P25-triggered cell death in *Nicotiana benthamiana*. **Molecular Plant Pathology**, v. 21, n. 11, p. 1495–1501, 2020.

YANG, Z. T.; LU, S. J.; WANG, M. J.; BI, D. L.; SUN, L.; ZHOU, S. F.; SONG, Z. T.; LIU, J. X. A plasma membrane-tethered transcription factor, NAC062/ANAC062/NTL6, mediates the unfolded protein response in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 79, n. 6, p. 1033–1043, 2014a.

YANG, Z. T.; WANG, M. J.; SUN, L.; LU, S. J.; BI, D. L.; SUN, L.; SONG, Z. T.; ZHANG, S. S.; ZHOU, S. F.; LIU, J. X. The Membrane-Associated Transcription Factor NAC089 Controls ER-Stress-Induced Programmed Cell Death in Plants. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 3, 2014b.

YE, C.; DICKMAN, M. B.; WHITHAM, S. A.; PAYTON, M.; VERCHOT, J. The Unfolded Protein Response Is Triggered by a Plant Viral Movement Protein. **Plant Physiology**, v. 156, n. 2, p. 741, 2011

YE, C. M.; CHEN, S.; PAYTON, M.; DICKMAN, M. B.; VERCHOT, J. TGBp3 triggers the unfolded protein response and SKP1-dependent programmed cell death. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 3, p. 241, abr. 2013.

YE, C.; VERCHOT, J. Role of unfolded protein response in plant virus infection. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, n. 8, p. 1212–1215, ago. 2011.

YU, C.-Y.; HSU, Y.-W.; LIAO, C.-L.; LIN, Y.-L. Flavivirus Infection Activates the XBP1 Pathway of the Unfolded Protein Response To Cope with Endoplasmic Reticulum Stress. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11868–11880, 2006.

YU, X.; NIU, H.; LIU, C.; WANG, H.; YIN, W.; XIA, X. PTI-ETI synergistic signal mechanisms in plant immunity. **Plant Biotechnology Journal**, v. 22, n. 8, p. 2113–2128, 12 ago. 2024.

ZHANG, L.; CHEN, H.; BRANDIZZI, F.; VERCHOT, J.; WANG, A. The UPR Branch IRE1-bZIP60 in Plants Plays an Essential Role in Viral Infection and Is Complementary to the Only UPR Pathway in Yeast. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 4, p. 1–37, 2015.

ZHANG, S.; HUANG, A.; ZHOU, X.; LI, Z.; DIETZGEN, R. G.; ZHOU, C.; CAO, M. Natural defect of a plant rhabdovirus glycoprotein gene: A case study of virus-plant coevolution. **Phytopathology**, v. 111, n. 1, p. 227–236, 1 jan. 2021.

