



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

Pepper ringspot virus: Estudo da resposta imune em *Nicotiana benthamiana* e utilização como vetor para produção de antígenos específicos contra Coguvírus

CATERYNNE MELO KAUFFMANN

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Tese de Doutorado

Brasília - DF, 2025

Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

Pepper ringspot virus: Estudo da resposta imune em *Nicotiana benthamiana* e utilização como vetor para produção de antígenos específicos contra Coguvírus

Caterynne Melo Kauffmann
Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fitopatologia.

Brasília - DF, 2025

CATERYNNE MELO KAUFFMANN

Pepper ringspot virus: Estudo da resposta imune em *Nicotiana benthamiana* e utilização como vetor para produção de antígenos específicos contra Coguvírus

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Tatsuya Nagata - PPG Fitopatologia - UnB
(Presidente da banca e orientador)

Dr. Cristiano Lacorte - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Membro titular externo)

Dr. Nicolau Brito da Cunha- Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
(FAV)
(Membro titular interno da UnB)

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

Dra. Alessandra de Jesus Boari- Embrapa Cerrados
(Membro suplente)

Agradecimentos

Ao querido leitor, compartilho os resultados deste estudo, e espero sinceramente que ele contribua de forma significativa para a sua formação acadêmica e seja útil em sua jornada de aprendizado.

Gostaria de iniciar meus agradecimentos dedicando aos meus pais, Ana Paula e Edson Kauffmann. Pela presença e amor.

Aos meus colegas de laboratório — Marina Vendramini, Amanda Batista, Paloma Queiroz, Stephanny Cárdenas, Macária Duarte e Bruno Arcanjo — minha imensa gratidão. O auxílio de cada um de vocês, seja nas orientações técnicas, nas discussões ou no simples apoio diário, foi essencial para que esse trabalho se concretizasse. Nenhum trabalho acadêmico é obra de uma única pessoa, e sem a colaboração de todos, esta tese não teria sido possível.

Aos meus amigos mais próximos — Mandy, Marina, Mac, Bruni, Vivian, Justin, Andreia, Andreza, Saulo, Alessandra, Kim Namjoon, Kim Seokjin, Min Yoongi, Jung Hoseok, Park Jimin, Kim Taehyung, Jeon Jungkook — agradeço de coração pelo apoio constante, pela amizade e por estarem ao meu lado em todos os momentos. Realizar um doutorado exige mais do que conhecimento técnico; exige resiliência emocional, e ter ao meu redor pessoas que acreditam em mim e me amam fez toda a diferença. Vocês tornaram essa jornada mais leve, mais alegre e infinitamente mais suportável.

Às minhas psicólogas, Drielly e Thaina Mansur, que estiveram comigo tanto nos momentos de dificuldades quanto nas alegrias, meu sincero agradecimento. Sua ajuda foi crucial para que eu pudesse equilibrar os desafios emocionais dessa caminhada.

A minha primeira orientadora de Iniciação Científica, que com sabedoria me direcionou para o campo da pesquisa e se manteve presente ao longo de toda a minha trajetória acadêmica, me incentivando, orientando e, sobretudo, acreditando no meu potencial. Sou profundamente grata por seu apoio contínuo.

Ao meu orientador, pela orientação rigorosa, pelo apoio constante e pela paciência ao longo dessa jornada. Sua expertise foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho e sua confiança no meu potencial foi um estímulo constante para a realização deste estudo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para minha trajetória acadêmica e pessoal.

Por fim, gostaria de fazer um agradecimento especial à Caterynne, que permaneceu firme e resiliente ao longo destes anos, mesmo diante de momentos difíceis. Sua determinação e coragem em continuar a jornada, apesar dos obstáculos, foi uma inspiração e um exemplo de perseverança.

Sumário

Resumo.....	ix
Abstract	xii
1. Introdução Geral.....	15
2. Revisão bibliográfica.....	17
2.1 Gênero <i>Tobravirus</i>	17
2.2 Construção de clones infecciosos de tobrevírus	21
2.3 Expressão heteróloga de genes em plantas.....	22
2.4 Imunidade de plantas.....	24
2.5 A cultura da melancia no Brasil	26
2.6 Principais viroses de melancia no país	27
2.7 Família <i>Phenuiviridae</i>	29
2.8 Gênero <i>Coguvirus</i>	30
2.9 <i>Coguvirus citrulli</i> e <i>Coguvirus henanense</i> (WCLaVs).....	31
3. Referências bibliográficas	34
CAPÍTULO 1: SPECIFIC ANTIBODY PRODUCTION USING RECOMBINANT PROTEINS TO ELUCIDATE SEED TRANSMISSION AND NUCLEAR LOCALIZATION OF <i>Coguvirus citrulli</i> AND <i>Coguvirus henanense</i> IN RADICLES OF WATERMELON CROP	41
Specific antibody production using recombinant proteins to elucidate seed transmission and nuclear localization of coguvirus citrulli and coguvirus henanense in radicles of watermelon crop.....	42
Abstract	42
1. Introduction	43
2. Materials and methods.....	44
2.1 Cloning of <i>N</i> genes to pepper ringspot virus vector	44
2.2 Agroinfection in <i>Nicotiana benthamiana</i> plants and transient expression.	46
2.3 Purification of recombinant <i>N</i> proteins	46

2.4	Production and purification of polyclonal antisera.....	47
2.5	DIBA, antigen-coating ELISA and Western blot.....	48
2.6	RT-PCR	49
2.7	Tissue blot immunobinding assay	49
2.8	Antigen-coating ELISA using seedlings for WCLaV-1 and -2 detection..	50
2.9	Confocal laser scanning microscopy	50
3.	Results	51
3.1	Expression and purification of N proteins and evaluation of the specificity and sensitivity of polyclonal antisera.....	51
3.2	Evaluation of polyclonal antibodies using DIBA, antigen-coating ELISA, and Western blot	52
3.3	Virus detection by antigen-coating ELISA, TBIA and immunolabeling using watermelon seedlings and seeds.....	55
4.	Discussion.....	57
5.	References	60
CAPÍTULO 2-	Estudo da reposta imune de <i>Nicotiana benthamiana</i> contra um mutante do vírus pepper ringspot virus.....	64
	Resumo.....	64
1.	Introdução	66
2.	Objetivos.....	69
2.1	Objetivo geral	69
2.2	Objetivos específicos.....	69
3.	Material e métodos	70
3.1	Material vegetal e condições de crescimento	70
3.2	Agroinfiltração de clone infeccioso de PepRSV em plantas de <i>N. benthamiana</i>	70
3.3	Ensaio histoquímico de H ₂ O ₂	71
3.4	Ensaio de deposição de calose.....	73

3.5 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) e expressão transiente mediada por <i>A. tumefaciens</i> em <i>N. benthamiana</i>	74
3.6 Preparação de RNA total e análise por RT-qPCR para seleção genes de referência e avaliação da expressão dos genes WRKY1, ACRE132 e SGT1	75
4. Resultados.....	79
4.1 Detecção de peróxido de hidrogênio em <i>Nicotiana benthamiana</i> nos clones 2 e 4 do PepRSV	79
4.2 Detecção de deposição de calose em <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas com os clones 2 e 4 do PepRSV	80
4.3 Nocaute do gene SGT1 (supressor do alelo G2 de skp1) de <i>N. benthamiana</i>	82
4.4 Avaliação da estabilidade gênica e seleção de genes de referência para a interação PepRSV/ <i>N. benthamiana</i>	84
5. Discussão	86
6. Conclusão	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
PRODUÇÃO DURANTE O DOUTORADO	98

Resumo

KAUFFMANN, Caterynne Melo. **Pepper ringspot virus: Estudo da resposta imune em Nicotiana benthamiana e utilização como vetor para produção de antígenos específicos contra Coguvírus** 2025. 98 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

Os vírus *Coguvirus citrulli* e *C. henanense*, conhecidos como watermelon crinkle leaf-associated virus (WCLaV-1 e WCLaV-2), pertencem ao gênero *Coguvirus* e foram recentemente detectados em plantas de melancia no Brasil, frequentemente em coinfecção com *Orthotospovirus arachianuli* (groundnut ringspot virus, GRSV). Plantas infectadas por WCLaVs e GRSV apresentaram sintomas de mosaico, enrolamento e redução do limbo foliar. Apesar da severidade dos sintomas, ainda há informações limitadas sobre a epidemiologia da doença no Brasil, incluindo perdas de produção, hospedeiros alternativos e vetores de transmissão. Para elucidar esses aspectos, é essencial dispor de ferramentas sensíveis e específicas para a detecção desses vírus. Neste contexto, este estudo teve como objetivo desenvolver anticorpos policlonais específicos contra WCLaV-1 e WCLaV-2. A estratégia adotada baseou-se na produção das proteínas do nucleocapsídeo (N) de WCLaV-1 e WCLaV-2 utilizando o vetor pepper ringspot virus (PepRSV) em *Nicotiana benthamiana* para expressão heteróloga. As proteínas recombinantes foram injetadas em coelhos, e os antissoros resultantes foram avaliados quanto à especificidade por *dot-immunobinding assay* (DIBA), *antigen-coating ELISA*, *tissue blot immunobinding assay* (TBIA) e *Western blot*. Além disso, análises de ELISA indicaram que WCLaV-1 apresentou uma taxa de infecção de 93,1% em sementes comerciais da cultivar 'Crimson Sweet', enquanto WCLaV-2 foi detectado em apenas 17,8%. A análise por TBIA confirmou a presença de WCLaV-1 em sementes e plântulas, e a microscopia confocal revelou que a proteína N de WCLaV-1 estava

predominantemente localizada no citoplasma dos tecidos da semente, sendo também detectada no núcleo das células da ponta da raiz. Os clones infecciosos do PepRSV, compostos por dois segmentos genômicos (RNA1 e RNA2), foram clonados no vetor binário pJL89. A agroinfiltração desse clone infeccioso via *Agrobacterium tumefaciens* em *N. benthamiana* resulta em infecção sistêmica, permitindo o uso do PepRSV como vetor viral para expressão heteróloga de proteínas. Esse sistema possibilita a substituição do gene da capa proteica (CP) do PepRSV pelo gene de interesse, permitindo, por exemplo, a expressão da CP de outro vírus em plantas infectadas. Durante experimentos com o clone infeccioso do PepRSV, um mutante do RNA2, denominado clone 4, foi identificado. Esse mutante apresentava uma mutação atípica, caracterizada pela inserção de uma citidina na extremidade 3' do gene da CP. A inoculação do clone 4 em *N. benthamiana* resultou na formação de lesões necróticas locais, um fenômeno semelhante à reação de hipersensibilidade “HR-like”. Em contraste, outro clone do RNA2, denominado clone 2, que apresenta a sequência genômica do tipo selvagem, induziu infecção sistêmica sem causar lesões locais. Diante da relevância desse achado, foram conduzidos estudos para compreender o mecanismo subjacente à indução da resposta “HR-like” pelo clone 4. Os experimentos buscaram avaliar a resposta imune de *N. benthamiana* infiltrada com o clone 4, investigando a ativação de espécies reativas de oxigênio, com ênfase no acúmulo de peróxido de hidrogênio, a deposição de calose, a expressão de genes relacionados à defesa via RT-qPCR e o impacto do nocaute do gene *SGT1*. Os resultados indicaram que plantas inoculadas com o clone 4 apresentaram acúmulo de peróxido de hidrogênio e deposição de calose, enquanto plantas infectadas pelo clone 2 mostraram apenas deposição de calose. Além disso, a expressão de genes indicadores de defesa foi maior em plantas infectadas pelo clone 4, e o nocaute do gene *SGT1* foi detectado. No entanto, análises adicionais ainda são necessárias para esclarecer

os mecanismos envolvidos e determinar se a resposta de defesa ocorre predominantemente via imunidade desencadeada por padrões (PTI) ou mediada por efetores (ETI). Os resultados deste estudo fornecem informações para o diagnóstico e compreensão da epidemiologia dos WCLaVs na cultura da melancia, destacando a transmissão por sementes como um fator relevante. Além disso, contribuem para o avanço no uso do PepRSV como vetor viral para expressão de antígenos e para a investigação das respostas imunes em *Nicotiana benthamiana*. A caracterização do clone 4 do PepRSV amplia o conhecimento sobre os mecanismos de defesa vegetal, permitindo novas abordagens para o estudo da interação vírus-planta e do desenvolvimento de estratégias de controle.

Palavras-chave: Melancia, sorologia, clone infeccioso, imunidade inata, morte celular programada

Abstract

KAUFFMANN, Caterynne Melo. **Pepper ringspot virus: Study of the immune response in *Nicotiana benthamiana* and use as a vector for production of specific antigen against Coguvirus virus.** 2025. 98 p. Thesis (PhD in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

The viruses *Coguvirus citrulli* and *C. henanense*, respectively known as watermelon crinkle leaf-associated virus (WCLaV-1 and WCLaV-2), respectively, belong to the genus *Coguvirus* and were recently detected in watermelon plants in Brazil, frequently co-infecting plants alongside *Orthotospovirus arachianuli* (groundnut ringspot virus, GRSV). Plants infected with WCLaVs and GRSV exhibit symptoms such as mosaic, leaf curling, and lamina reduction. Despite the severity of these symptoms, limited information is available on the epidemiology of the disease in Brazil, including yield losses, alternative hosts, and transmission vectors. To address these gaps, the development of sensitive and specific detection tools for these viruses is essential. This study aimed to develop specific polyclonal antibodies against WCLaV-1 and WCLaV-2. The approach involved the production of nucleocapsid (N) proteins of WCLaV-1 and WCLaV-2 using pepper ringspot virus (PepRSV) as a viral vector in *Nicotiana benthamiana* for heterologous expression. The recombinant proteins were injected into rabbits, and the resulting antisera were evaluated for specificity using dot-immunobinding assay (DIBA), antigen-coating ELISA, tissue blot immunobinding assay (TBIA), and Western blot. Additionally, ELISA analyses indicated that WCLaV-1 exhibited a 93.1% seed infection rate in commercial seeds of the 'Crimson Sweet' cultivar, whereas WCLaV-2 was detected in only 17.8% of samples. TBIA analysis confirmed the presence of WCLaV-1 in seeds and seedlings, and confocal microscopy revealed that the N protein of WCLaV-1 was predominantly localized in the cytoplasm of seed tissues, with

additional detection in the nuclei of root-tip cells. Infectious clones of PepRSV, composed of two genomic segments (RNA1 and RNA2), were cloned into the binary vector pJL89. Agroinfiltration of these infectious clones via *Agrobacterium tumefaciens* in *N. benthamiana* resulted in systemic infection, enabling the use of PepRSV as a viral vector for heterologous protein expression. This system allows for the replacement of the PepRSV coat protein (CP) gene with a gene of interest, facilitating, for example, the heterologous expression of a foreign CP in infected plants. During experiments with the PepRSV infectious clone, a mutant of RNA2, designated clone 4, was identified. This mutant carried an atypical mutation characterized by the insertion of a cytidine at the 3' end of the CP gene. Inoculation of clone 4 into *N. benthamiana* resulted in the formation of local necrotic lesions resembling a hypersensitive response (HR-like). In contrast, another RNA2 clone, designated clone 2, retained the wild-type genomic sequence and induced systemic infection without local lesions. Given the significance of this finding, further studies were conducted to elucidate the mechanism underlying the HR-like response induced by clone 4. The experiments aimed to evaluate the immune response of *N. benthamiana* infiltrated with clone 4, focusing on the activation of reactive oxygen species, particularly hydrogen peroxide accumulation, callose deposition, expression of defense-related genes via RT-qPCR, and the impact of *SGT1* gene silencing. The results showed that plants inoculated with the clone 4 exhibited both hydrogen peroxide accumulation and callose deposition, whereas plants infected with the clone 2 displayed only callose deposition. Additionally, the expression of defense marker genes was significantly higher in plants infected with the clone 4, and *SGT1* gene silencing was detected. However, further analyses are required to clarify the mechanisms involved and determine whether the defense response is primarily mediated by pattern-triggered immunity (PTI) or effector-triggered immunity (ETI). The findings of this study

contribute to the diagnosis and epidemiological understanding of WCLaVs in watermelon cultivation, highlighting seed transmission as a relevant factor. Furthermore, they advance the application of PepRSV as a viral vector for antigen expression and the investigation of immune responses in *N. benthamiana*. The characterization of PepRSV clone 4 enhances our understanding of plant defense mechanisms, enabling new approaches for studying virus-plant interactions and developing control strategies.

Keywords: Watermelon, serology, infectious clones, innate immunity, programmed cell death.

1. Introdução Geral

A melancia (*Citrullus lanatus*) é uma das culturas de maior importância econômica mundial, amplamente consumida em diversas formas, como in natura, sucos, geleias e sorvetes. Sua produção é liderada pela China, seguida por outros grandes produtores, como Índia e Turquia, com destaque para o Brasil, onde o cultivo é significativo, especialmente na região Nordeste (Santos et al., 2011; FAOSTAT, 2024; IBGE, 2023). No entanto, a cultura enfrenta perdas substanciais de produtividade devido à infecção por vírus fitopatogênicos. Os vírus *Coguvirus citrulli* e *C. henanense* (WCLaV-1 e WCLaV-2), membros do gênero *Coguvirus*, família *Phenuiviridae*, foram relatados pela primeira vez recentemente na China causando perdas na cultura da melancia (Xin et al., 2017). Posteriormente, ambos foram relatados nos Estados Unidos, nos estados do Texas (Hernandez et al. 2021), e na Flórida em infecção mista com o cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV) (Hendricks et al. 2022). No Brasil, WCLaV-1 e -2 foram relatados em infecção mista com o *Orthotospovirus arachianuli* (GRSV), causando sintomas de mosaico e deformações foliares (Maeda et al., 2021). A expansão global do WCLaV-1 e -2 tem gerado preocupações, especialmente para as empresas produtoras de sementes, devido à hipótese de transmissão viral por sementes (Mulholland et al., 2023). A transmissão por sementes é um fator crucial na propagação desses vírus, embora não existam estudos aprofundados sobre as perdas de produção causadas pela presença desses agentes virais nos campos de melancia, tampouco sobre seu impacto em termos de severidade e incidência.

A detecção de vírus em materiais vegetais coletados em campo é frequentemente realizada por métodos sorológicos, que são acessíveis e adequados para análises em larga escala, em comparação com métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) (Agrios, 2005). Antissoros específicos

podem ser ferramentas para o estudo da disseminação viral nas plantas e sua localização subcelular, sendo tipicamente produzidos por imunização de coelhos ou camundongos com partículas purificadas de vírus de plantas. Contudo, a produção de antissoros por meio de vírus purificados encontra obstáculos devido a dificuldades no isolamento, preparação de plantas infectadas com um único isolado e baixos títulos virais em plantas (Hull, 2014). Especificamente, o isolamento de vírus como WCLaV-1, WCLaV-2 e GRSV é desafiador devido à infecção mista, à ausência de plantas indicadoras para induzir lesões locais e à falta de vetores de transmissão identificados para os WCLaVs. Como alternativa, propõe-se a produção de proteínas recombinantes dos WCLaVs a partir de expressão heteróloga.

O pepper ringspot virus (PepRSV), um tobavírus com genoma bipartido (RNA1 e RNA2), tem sido amplamente utilizado em pesquisas para expressão heteróloga de genes (Tavares-Esashika et al., 2021; Andrade et al., 2023; Fogaça et al., 2024). Para o desenvolvimento do PepRSV como vetor viral, clones infecciosos de PepRSV foram desenvolvidos a partir do isolado Ag1 de tomateiro. Surpreendentemente, o RNA 2 apresentou dois clones com diferenças fenotípicas notáveis: o clone 2, que induz infecção sistêmica, e o clone 4, que, devido a uma mutação no gene da capa proteica (CP), gerando lesões localizadas e uma resposta semelhante à hipersensibilidade “HR-like” (Tavares-Esashika, 2021).

O PepRSV como vetor viral de expressão heteróloga, dependendo do gene utilizado, causa lesões do tipo “HR-like” semelhantes às lesões que ocorrem com o clone 4 de PepRSV. Assim, este estudo propõe o uso do vetor PepRSV para a expressão de抗ígenos dos WCLaVs, visando a produção de antissoros específicos. Duas hipóteses foram levantadas: a primeira sugere que o PepRSV pode ser uma ferramenta eficaz para a produção de抗ígenos contra os WCLaVs, enquanto a segunda propõe que suas

limitações podem comprometer a geração desses antígenos. Além disso, o estudo busca investigar a resposta imune de *Nicotiana benthamiana* aos clones 2 e 4 do PepRSV como uma estratégia para compreender a interação vírus-planta, com foco na indução de uma resposta de hipersensibilidade “HR-like” e melhoria do vetor viral como ferramenta biotecnológica. Para o estudo do mutante do vírus PepRSV (clone 4), duas hipóteses distintas foram formuladas: a primeira sugere que a resposta do tipo “HR-like” induzida pelo clone 4 pode ser resultado do acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células, um tipo de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou *reactive oxygen species* (ROS), acompanhada pela deposição de calose, processo potencialmente mediado pela resposta de imunidade inata (pattern-triggered immunity, PTI). A segunda hipótese propõe que, embora o acúmulo de peróxido de hidrogênio e a deposição de calose também estejam presentes, esses eventos podem não estar relacionados ao PTI, mas sim à ativação de uma resposta de resistência mediada por efetores (effector-triggered immunity, ETI).

Este estudo visa contribuir para o aprimoramento das estratégias de diagnóstico de coguvírus na melancia, oferecendo novas perspectivas sobre as interações entre vírus e plantas. Além disso, busca expandir o uso do PepRSV como uma ferramenta biotecnológica eficaz na produção de antígenos virais.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Gênero *Tobravirus*

Os vírus da família *Virgaviridae* possuem partículas tubulares rígidas sem envelope. Apresentam dois segmentos de comprimentos diferentes, o segmento maior varia de 180-215 nm e o segmento menor varia de 46-115 nm; o diâmetro de partícula pode variar de 20-23,1 nm (MacFarlane, 2010). O gênero *Tobravirus* possui três espécies relatadas no mundo: *Tobravirus tabaci* (tobacco rattle virus, TRV), *T. pisi* (pea early

browning virus, PEBV) e o *T. capsici* (pepper ringpost virus, PepRSV) (Adams et al., 2017). Os tobrevírus possuem dois segmentos genômicos de RNA (RNA 1 e RNA 2) e apresentam uma estrutura semelhante a tRNA na região 3' do genoma (Offord, 1966), ambos de fita simples e senso positivo, que são encapsidados individualmente. O isolado CAM de PepRSV (RNA1: L23972; RNA2: LC639337) foi o primeiro a ser identificado em Campinas, São Paulo (Bergh et al., 1985).

O genoma do RNA1 do PepRSV (Figura 1) codifica 3 ORFs (open reading frames). A ORF1 é responsável pela produção de proteínas associadas à replicação viral e possui uma estrutura CAP na extremidade 5'. A ORF1 é dividida na subunidade menor, denominada ORF1a (134-141 kDa), que contém domínios de metiltransferase e helicase; e na subunidade maior, denominada ORF1b, que codifica a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). Essa subunidade é expressada por meio do mecanismo “ribosomal readthrough” da ORF1a (Rodrigues et al., 2015) como proteína fusionada da ORF1 (194-201 kDa). A ORF2 codifica a proteína de movimento (MP) célula-a-célula (29-30 kDa) e a ORF3 codifica o supressor de silenciamento gênico (VSR), p16, que tem papel na interferência da formação do complexo RISC por meio de associação com a proteína AGO 4 (16 kDa) (Ghazala et al., 2008; Martín-Hernández & Baulcombe, 2008; Rodrigues et al., 2015). As proteínas codificadas pela ORF1 (metiltransferase, helicase e RdRp) são traduzidas diretamente do RNA 1, enquanto as proteínas codificadas pelas ORF2 e ORF3 (MP e p16) são traduzidas a partir dos RNAs sub-genômicos (sgRNAs) (Robinson, 1983; Goulden et al., 1990).

O RNA 2 codifica uma proteína capsidial (CP) (22-24 kDa) e as proteínas não estruturais 2b e 2c , localizadas a jusante da CP, que estão envolvidas na transmissão por nematoides vetores (Hughes et al., 1986; MacFarlane et al., 1995). O RNA2 apresenta uma variação significativa (1,8–3,9 kb) entre diferentes isolados de tobrevírus. Em alguns

casos, um ou ambos os genes 2b e 2c podem estar ausentes e a região 3' do RNA2 pode ser substituída por recombinação com fragmentos 3' do RNA1 (MacFarlane, 2010). A deleção das proteínas 2b e 2c do RNA 2 pode afetar a transmissão pelos nematoides dos gêneros *Trichodorus* e *Paratrichodorus* (*Trichodoridae*), que são os vetores naturais dos membros do gênero *Tobravirus*. Para o vírus PepRSV não é conhecido qual o gênero do vetor de transmissão. Acredita-se que a proteína 2b tem importância na distribuição do vírus entre o caule e a raiz da plantas (Vassilakos et al., 2001).

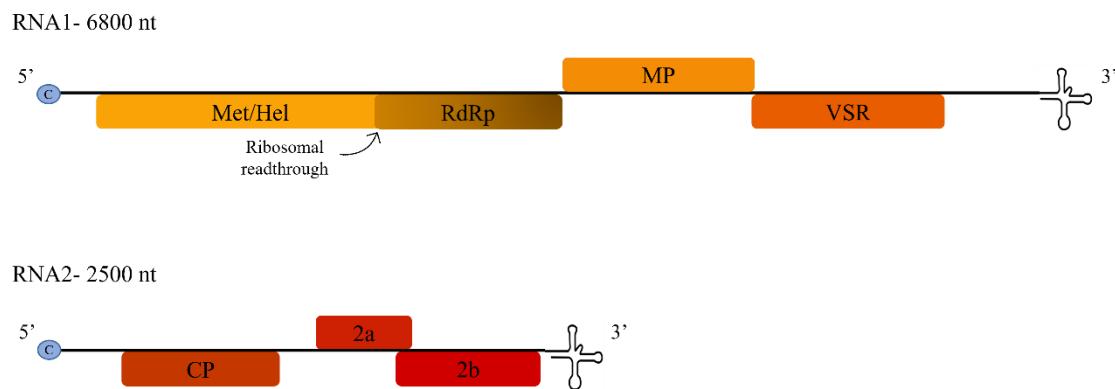


Figura 1. Organização genômica do *Tobravirus capsici* (PepRSV). O RNA 1 e 2 possuem uma estrutura CAP na extremidade 5' representado pelo círculo azul e uma estrutura semelhante a tRNA na UTR 3'. As ORFs estão representadas pelos retângulos: Met/Hel (metiltransferase/helicase), RdRp (RNA polimerase dependente de RNA), MP (proteína de movimento), VSR (supressor de silenciamento gênico), CP (capa proteica).

O PepRSV, até o momento, foi descrito apenas no Brasil (Silberschmidt, 1963; Kitajima, 1969) e África do Sul (EPPO, 2024) e pode causar doença principalmente em pimentão e tomate (Kitajima et al., 1969; MacFarlane, 1999; Adams et al., 2012). Existem quatro isolados de PepRSV com o RNA2 sequenciado: CAM (NC003670), Pivo4 (AB826687), LAV (AB826686) e Ag1 (LC842169) (Bergh et al., 1985; Batista et al., 2014; Tavares-Esashika et al., 2020; Tavares-Esashika, 2021). O isolado CAM tem origem em Campinas, São Paulo. Esse isolado foi o primeiro a ser identificado e caracterizado, sendo que não apresenta os genes que codificam as proteínas 2b e 2c.,

provavelmente relacionado à deleção genômica pela manutenção contínua do isolado devido a sucessivas inoculações mecânicas (Tavares-Esashika, 2021). Os isolados LAV e Pivo4 têm origem na região de Luziânia, Goiás (Batista et al., 2014). A sequência do RNA2 do isolado LAV contém apenas o gene da CP e o que codifica a proteína 2b, que não é homóloga à proteína 2b do TRV e do PEBV (Batista et al., 2014). O isolado Pivo4 apresenta uma deleção de 167 nucleotídeos na extremidade 3' do RNA2 comparado com o isolado LAV, resultando na ausência das proteínas 2b e 2c (Batista et al., 2014). O isolado mais recente de PepRSV foi identificado em Alexandre Gusmão, Distrito Federal, infectando tomateiro, isolado denominado PepRSV Ag1 (Tavares-Esashika, 2021). Quatro clones infecciosos foram produzidos oriundos de cada um dos isolados CAM, LAV, Pivo4 e Ag1 em vetor binário pJL89 (Tavares-Esashika et al., 2020, Tavares-Esashika, 2021) com propriedades similares entre eles.

Plantas infectadas apenas com a partícula viral longa (RNA1) apresentam um tipo de infecção conhecido como NM (não multiplicadora), assim os vírus conseguem se replicar e se mover sistemicamente pela planta, mesmo na ausência da CP (MacFarlane, 2010). Essa característica é atribuída ao RNA1 do PepRSV, que codifica proteínas essenciais para a replicação e movimentação, sem a necessidade de RNA2, que contém os genes para outras proteínas estruturais, incluindo a CP (Tavares-Esashika, 2021). Observações realizadas em campos de batata infectados com TRV demonstram que infecções do tipo NM podem ocorrer naturalmente, facilitando a disseminação do vírus sem que partículas completas sejam formadas (MacFarlane, 2010; Harrison & Robinson, 1978), assim apenas o RNA1 está presente, não produzem partículas virais e não são transmissíveis por tricodóridos (Van Griethuysen et al. 2024). Estudos demonstraram que apenas o RNA1 do TRV pode induzir sintomas sistêmicos em *Nicotiana benthamiana* e *N. clevelandii* (Swanson et al., 2002). Além disso, foi demonstrado que o PepRSV se

move através do sistema vascular e é distribuído para as folhas jovens, evidenciando que os tobrevírus não dependem da CP para o movimento de longa distância (Tavares-Esashika et al., 2020). Swanson e colaboradores (2002) também observaram que a região C-terminal da CP auxilia no transporte de RNA1 e RNA2 em conjunto, mesmo sem a formação de partículas virais completas. Plantas infectadas com as partículas longas (RNA1) e curtas (RNA2) apresentam infecção do tipo M (multiplicadora) (Cadman & Harrison, 1959). Nesse tipo de infecção, ocorre a síntese da CP e da proteína responsável pela transmissão pelo vetor (nematoides), devido à presença do segmento genômico RNA2 (Cadman & Harrison, 1959; Sänger, 1969). Nas infecções do tipo M, as plantas contêm tanto RNA1 quanto RNA2; como o RNA2 codifica a CP, essas infecções resultam na formação de partículas virais (Van Griethuysen et al., 2024).

2.2 Construção de clones infecciosos de tobrevírus

O primeiro clone infeccioso de tobrevírus foi desenvolvido por Hamilton & Baulcombe (1989) e abrangia apenas o segmento genômico RNA1 do TRV, isolado SYM. Para esse experimento, foi utilizado o plasmídeo pPM1 (Ahlquist & Janda, 1984), que continha os promotores T4, T7 e SP6, necessários para a síntese de transcritos e posterior inoculação em plantas de *Nicotiana tabacum*. A síntese de RNA1 foi confirmada por Northern blotting apenas 15 minutos após a inoculação (Hamilton & Baulcombe, 1989). No mesmo ano, Angenent et al. (1989) desenvolveram o clone infeccioso para o RNA2 do TRV, isolado PLB. A pseudorecombinação envolvendo o RNA1 do isolado SYM e o RNA2 do isolado PLB resultou em alta infectividade. Posteriormente, foram produzidos outros clones infecciosos de TRV e PEBV por diferentes grupos (MacFarlane et al., 1992; Hernández et al., 1995; MacFarlane et al., 1996), utilizando a síntese de transcritos *in vitro*. Uma estratégia alternativa para a construção de clones infecciosos de vírus de plantas foi desenvolvida por Herrera-Estrella

et al. (1983) e Zambryski et al. (1983); essa abordagem utiliza um vetor binário contendo o promotor p35S do cauliflower mosaic virus (CaMV), e um terminador eucariótico eficiente, como o terminador da nopalina sintase (NOS). O cDNA do genoma viral completo é inserido entre o promotor e o terminador, na região do T-DNA. A inoculação é realizada pela infiltração de *Agrobacterium tumefaciens* transformada com esta construção em planta susceptível a infecção viral. Isso resulta na transcrição do genoma viral e recuperação viral dentro da célula infiltrada (Hellens et al., 2000). O clone infeccioso do PepRSV foi produzido utilizando essa estratégia com o plasmídeo pJL89 (Lindbo, 2007), que é um vetor binário. A combinação dos dois RNAs do PepRSV demonstrou alta infectividade em plantas inoculadas de *N. benthamiana* (Tavares-Esashika et al., 2020).

2.3 Expressão heteróloga de genes em plantas

Nos últimos anos, a expressão transiente de genes utilizando células de *Agrobacterium* e plantas tem ganhado destaque em estudos de função proteica, interação patógeno-hospedeiro e na produção de biofármacos e produtos biotecnológicos (Zhang et al., 2024). A técnica consiste na infiltração de uma suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* recombinante em tecido foliar, facilitando a transferência de T-DNA para as células da planta (Obembe et al., 2011; Zhang et al., 2024; Liu et al., 2024). No entanto, uma desvantagem desse método é que a expressão transiente ocorre de forma passageira, durando apenas alguns dias (Penney et al., 2011; Obembe et al., 2011).

Os vetores de vírus vegetais utilizados para a expressão de genes são valorizados por seu potencial de produzir grandes quantidades de proteínas recombinantes em um curto período (Hefferon, 2012; Huang et al., 2024). No entanto, a quantidade de proteína produzida pode variar devido a diferentes fatores, como o vetor escolhido e o desenho

dos genes (Tyurin et al., 2020). O TRV é um exemplo de vetor de silenciamento genético induzido por vírus (VIGS), esse vírus induz infecção sistêmica e sintomas leves, infecta grandes áreas de células adjacentes por meio do movimento célula-a-célula e pode silenciar a expressão genética em pontos de crescimento do hospedeiro (Ratcliff et al., 2001). As características do vetor viral TRV são vantajosas e o uso desse vetor representa uma opção atraente para a expressão de genes em estudos de biotecnologia. Uma das principais vantagens do TRV é que a ativação da imunidade nas plantas, desencadeada por padrões moleculares associados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), é menos intensa em comparação com outros vetores virais, como o tobacco mosaic virus (TMV) (Kumagai et al., 1995), o tomato golden mosaic virus (TGMV) (Kjemtrup et al., 1998) e o potato virus X (PVX) (Ruiz et al., 1998). Entretanto, os pesquisadores enfrentam desafios no Brasil para a utilização do TRV como vetor viral. O vírus não está presente no país, o que pode complicar sua introdução e uso em experimentos (Tavares-Esashika, 2021). Além disso, existem barreiras fitossanitárias rigorosas que visam prevenir a introdução de patógenos exóticos, o que tornaria ainda mais difícil o uso desse vetor no território brasileiro (Ratcliff et al., 2001; Tavares-Esashika et al., 2020)."

O único vírus presente no Brasil que apresenta características semelhantes ao vetor viral TRV é o PepRSV. Assim, ele foi utilizado como base para o desenvolvimento de um novo vetor viral, que não apenas permite a expressão de genes, mas também promove o silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS), tornando-se uma ferramenta valiosa para a pesquisa genética e o estudo de funções gênicas (Tavares-Esashika et al., 2020).

Vale a pena salientar que além da escolha do vetor viral, diversos outros fatores podem influenciar a eficácia da produção de proteínas heterólogas em plantas. Por exemplo, a adição de compostos como ácido lipóico, pluronic F-68 e polivinilpirrolidona

podem ajudar a otimizar o ambiente celular para a expressão gênica (Norkunas et al., 2018).

Novos protocolos de clonagem têm sido desenvolvidos para otimizar a construção de genes recombinantes, um desses métodos é o Gibson Assembly® (GA), que foi utilizado no desenvolvimento do vetor viral PepRSV (Tavares-Esashika et al., 2020). Essa técnica é utilizada para unir dois ou mais fragmentos de DNA que foram previamente preparados por PCR e que possuem sequências sobrepostas (Gibson et al., 2009). O protocolo de GA utiliza uma combinação de enzimas, incluindo exonuclease T5, que remove nucleotídeos das extremidades na direção 5' para 3', uma polimerase de DNA termoestável e ligase de DNA termoestável, que realiza a ligação dos fragmentos de DNA. Essa abordagem é vantajosa porque não utiliza enzimas de restrição, permitindo uma maior flexibilidade na manipulação do DNA e resultando em um produto que não contém cortes ou lacunas (seamless cloning) (Gibson et al., 2009). Essa metodologia simplifica o processo de clonagem e possibilita a criação de construções genéticas mais complexas de forma rápida e eficiente (Blawid & Nagata, 2015; Tavares-Esashika et al., 2020; Andrade et al., 2023).

2.4 Imunidade de plantas

As plantas possuem diversos mecanismos para combater patógenos, como respostas a PAMP mediada por receptores de reconhecimento de padrões (pattern recognition receptors, PRRs) presentes na superfície celular, a explosão oxidativa de espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species, ROS) e deposição de calose e o acúmulo do composto fenólico ácido salicílico (AS) (Tateda et al., 2014; Garcia-Ruiz, 2019). Diversos relatos mostram que o AS regula vias de defesa contra patógenos, pois sua concentração elevada em condições de estresse induz o acúmulo de ROS e ativação de

reação conhecida como “HR-like”, explicado abaixo (Chen et al., 2009; Wang et al., 2013; Tateda et al., 2014; Xia et al., 2015).

Durante a defesa da planta contra patógenos, sinais exógenos chamados de padrões moleculares associados a danos (damage-associated molecular patterns, DAMPs) são ativados, sinalizando a presença de estresse ou dano tecidual (Macho & Zipfel, 2014). Quando os PRRs detectam padrões PAMPs, ocorre a ativação da imunidade desencadeada por padrões (pattern-triggered immunity, PTI). Essa resposta inicial inclui uma cascata de sinais de transdução que leva à reprogramação da expressão gênica e à síntese de moléculas específicas de defesa, reforçando a proteção da planta (Bigeard et al., 2015). Além disso, as proteínas R desempenham um papel fundamental no reconhecimento dos efetores produzidos pelos patógenos, podendo identificá-los de forma direta ou indireta, assim quando proteínas reconhecem os efetores, a imunidade desencadeada por efetores (effector-triggered immunity, ETI) é ativada, desencadeando uma resposta de defesa mais forte (Howden & Huitoma, 2012; Yu et al., 2024). A via do ácido salicílico (AS) e as moléculas de ROS atuam de forma coordenada para efetivar a resposta de resistência da planta, potencializando a defesa contra infecções (Xia et al., 2015). Os receptores celulares agem como detectores que integram sinais de patógenos e desencadeiam uma cascata de reações de defesa na planta (HR, ROS, influxo de cálcio, cascata de MAPK), propagando essa resposta por todo o organismo (Ngou et al., 2022a). O sistema imunológico vegetal opera em um estado de cooperação mútua, onde o PTI pode ser visto como o precursor do ETI, sendo uma versão intensificada do PTI, intensificando a resposta inicial e estendendo sua duração para uma proteção mais robusta. O PTI e o ETI atuam de forma sinérgica para fortalecer a resistência às doenças, desencadeando conjuntamente uma série de respostas de defesa subsequentes (Ngou et al., 2022b, Yu et al., 2024).

A resposta semelhante à hipersensibilidade (HR-like), é um mecanismo de defesa das plantas contra patógenos diferente da HR clássica, em que ocorre uma morte celular programada localizada nas células próximas ao ponto de infecção, limitando a propagação do patógeno, sendo que essa resposta é acompanhada por um acúmulo de ROS e pela produção de outras moléculas de defesa (Yoda et al., 2003; Xu et al., 2024). Quando uma reação é descrita como “HR-like”, significa que ela compartilha características com a hipersensibilidade, mas pode não ser idêntica em intensidade ou na forma como é acionada. A “HR-like” é uma forma de morte celular programada comum em plantas, mas pode ser induzida por diversos fatores, fato que torna a sua compreensão complicada (Balint-Kurti, 2019). Tendo essa visão, alguns autores começaram a utilizar o termo “morte celular semelhante à hipersensibilidade”, para ilustrar somente a morte celular, ainda sem saber se existe ligação com genes *R*, resposta de defesa e/ou resistência a doenças, ressaltando que as reações de HR não são idênticas e podem ser ativadas por diversos estímulos (Balint-Kurti, 2019).

2.5 A cultura da melancia no Brasil

A melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai], pertencente à família Cucurbitaceae, tem suas origens nas regiões tropicais da África Equatorial e é uma das culturas olerícolas mais importantes do Brasil. Essa cultura é atrativa para os agricultores, pois oferece um retorno financeiro rápido, devido ao seu ciclo de cultivo curto e à simplicidade de manejo em comparação com outras hortaliças (Boari et al., 2017). A planta apresenta um crescimento estolonífero, com ramos que podem atingir até 5 metros de comprimento. Suas gavinhas desempenham um papel crucial na fixação, enquanto o sistema radicular é superficial, alcançando profundidades de até 30 centímetros, suas

flores são monoicas, ou seja, apresentam flores femininas e masculinas separadamente (Lambert et al., 2017).

Os três principais países produtores de melancia estão localizados na Ásia: China, Turquia e Índia. O Brasil ocupa a quinta posição no *ranking* mundial de produção de melancia (FAOSTAT, 2024). As cultivares comercializadas são agrupadas em diferentes grupos, como Crimson Sweet, Charleston Gray, Jubilee, Omaro Yamato, Mini Melancias e Melancia sem Sementes. Esses grupos são diferenciados com base em características como tipo, resistência a doenças e grau Brix (Lima, 2014). Dentre essas, o grupo Crimson Sweet se destaca por oferecer uma variedade significativa de cultivares e por ser o preferido no mercado brasileiro, devido às suas boas características para cultivo, transporte e consumo (Lima, 2014). Os frutos da cultivar Crimson Sweet são arredondados, pesando cerca de 10 kg, com casca clara e estrias verde-escuro, além de uma polpa de coloração vermelha intensa. Quando cultivados sob irrigação adequada, esses frutos tendem a apresentar características agronômicas superiores, como uniformidade no tamanho e alto grau Brix (Chaves et al., 2013). A melancieira é vulnerável a ataques de diversos patógenos, com os vírus representando agentes etiológicos significativos que comprometem a produção e a produtividade das lavouras (Lima, 2014). As cucurbitáceas frequentemente sofrem infecções mistas por diferentes vírus, que, quando atuam de forma sinérgica, podem resultar em um aumento da severidade das infecções, intensificando a virulência dentro das populações de plantas (Ramos et al., 2003; Aguiar et al., 2015). Essa interação complexa entre vírus pode levar a consequências severas para a cultura, ressaltando a importância de estratégias de manejo eficazes para mitigar os danos causados por essas infecções.

2.6 Principais viroses de melancia no país

As doenças virais são um dos principais problemas enfrentados pelas cucurbitáceas, especialmente pela melancia, apresentando alta incidência e variação na severidade, resultando com frequência em perdas significativas na produção e produtividade (Lima, 2014). Os principais sintomas associados à infecção viral em melancia incluem mosaico, bolhosidade, epinastia, necrose, clorose e deformações na casca dos frutos. Infecções mistas podem agravar esses sintomas, levando a distorções nas folhas e protuberâncias severas nos ramos da planta (Aguiar et al., 2015).

Diversos vírus são frequentemente encontrados no cultivo de melancia no Brasil, entre os quais se destacam o *Potyvirus papayanuli* (papaya ringspot virus – tipo watermelon, (PRSV-W), o *Potyvirus cucurbitaflavitesselati* (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) e o *Potyvirus citrulli* (watermelon mosaic virus, WMV), todos pertencentes ao gênero *Potyvirus*. Também estão presentes o *Cucumovirus CMV* (cucumber mosaic virus, CMV), do gênero *Cucumovirus*, o *Comovirus cucurbitae* (squash mosaic virus, SqMV), do gênero *Comovirus*, e o *Orthotospovirus cucurbichlorosis* (zucchini lethal chlorosis virus, ZLCV), do gênero *Orthotospovirus* (revisado em Kitajima, 2020).

O vírus *Orthotospovirus arachianuli* (groundnut ringspot virus, GRSV), do gênero *Orthotospovirus*, foi relatado em melancias no estado de São Paulo, causando sintomas como mosaico, deformações e lesões necróticas nas folhas, além de manchas necróticas nos frutos (Leão et al., 2015). Testes de transmissão indicaram que o GRSV pode ser transmitido por tripes da espécie *Frankliniella schultzei* (Nagata et al., 2004).

O *Coguvirus citrulli* e o *Coguvirus henanense* (watermelon crinkle leaf-associated virus 1 e 2, WCLaV-1 e WCLaV-2, respectivamente), pertencentes à família *Phenuiviridae*, gênero *Coguvirus*, foram reportados na China (Xin et al., 2017) e nos Estados Unidos (Hernandez et al., 2021), onde causam sintomas característicos, como

mosaico amarelo e deformação foliar em campos de produção. Análises do gene do nucleocapsídeo dos vírus WCLaV-1 e WCLaV-2 revelaram a presença de regiões conservadas comuns a membros dos gêneros *Tenuivirus* e *Phlebovirus*, o que levou a sua classificação inicial na família *Phenuiviridae* (Xin et al., 2017; Hernandez et al., 2021). Posteriormente, pesquisas filogenéticas sugeriram que esses vírus devem ser classificados como pertencentes ao gênero *Coguvirus* (Zhang et al., 2021). Detalhes adicionais sobre a família e o gênero desses vírus são apresentados a seguir. Esses três vírus (GRSV, WCLaV-1 e -2) foram encontrados em infecções mistas em cultivos na região Nordeste do Brasil (Maeda et al., 2021). A literatura científica sobre esse patossistema ainda é limitada, com lacunas significativas em relação à detecção específica e sensível dos agentes patogênicos, especialmente em métodos de baixo custo que possibilitem a análise de um grande número de amostras. Além disso, ainda há uma escassez de informações sobre as perdas causadas pela infecção, as formas de transmissão e a identificação de hospedeiros alternativos. A falta de dados compromete a compreensão da doença, evidenciando a necessidade de mais estudos para desenvolver técnicas eficientes e acessíveis, fundamentais para o controle da doença.

2.7 Família *Phenuiviridae*

A família *Phenuiviridae*, pertence à ordem *Bunyavirales*, é composta por 20 gêneros reconhecidos, sendo três relevantes como agentes etiológicos de plantas: *Coguvirus*, *Rubodvirus* e *Tenuivirus*. Essa família caracteriza-se por vírus com genomas de RNA segmentado, de sentido negativo e ambisenso, variando de 8,1-25,1 kb no total de nucleotídeos. Os vírions são, em sua maioria, envelopados, com morfologia esférica, embora também existam casos de vírus não envelopados, como os *Coguvirus*. Os segmentos do genoma de RNA apresentam terminais parcialmente complementares. Em

geral, os vírus dessa família codificam quatro proteínas estruturais: uma proteína grande (L), codificada pelo segmento L ou RNA1; duas glicoproteínas externas (Gn e Gc) — sendo que nem todos os membros dessa família codificam ambas as glicoproteínas —, codificadas pelo segmento M; e a proteína do nucleocapsídeo (N), codificada pelo segmento S ou RNA3 (ou RNA2, caso o vírus não possua glicoproteína). (Diaz-Lara et al., 2019; Sasaya et al., 2023).

Uma característica importante a se notar é que as glicoproteínas estruturais não estão presentes nos gêneros *Coguvirus* e *Rubodvirus*, o que é uma propriedade comum entre os membros da ordem *Bunyavirales* (Diaz-Lara et al., 2019). Entre as proteínas que são encontradas na família, destacam-se a polimerase de RNA dependente de RNA (RdRP), a proteína de movimento (MP) e a proteína do nucleocapsídeo (N). Adicionalmente, as espécies do gênero *Coguvirus* podem apresentar duas ORFs que são separadas por uma longa região intergênica rica em A/U (adenina/uracila), que adota uma conformação de *hairpin* dentro do mesmo segmento genômico (Navarro et al., 2018a; Zhang et al., 2021).

2.8 Gênero *Coguvirus*

As espécies do gênero *Coguvirus* são caracterizadas por partículas alongadas e flexíveis, medindo aproximadamente 200 a 300 nm, e não são envelopadas (Navarro et al., 2018a). Este gênero inclui sete espécies aceitas pelo ICTV: *Coguvirus citri* e *Coguvirus eburi*, conhecidos popularmente como citrus concave gum-associated virus (CCGaV) e citrus virus A (CiVA), respectivamente, ambos relatados em laranjeiras doces no sul da Itália (Navarro et al., 2018a; 2018b); *Coguvirus chinense* (brassica campestres chinensis coguvirus 1, BCCoV1); *Coguvirus chrysanthae* (edgeworthia chrysanthae mosaic associated virus, ECMaV); *Coguvirus yunnanense* (Yúnnán paris negative-

stranded virus, YPNSV); e *Coguvirus citrulli* (watermelon crinkle leaf-associated virus 1, WCLaV-1) e *Coguvirus henanense* (watermelon crinkle leaf-associated virus 2, WCLaV-2), ambos relatados em melancieiras no Brasil (Maeda et al., 2021). O critério de demarcação de espécies para este gênero inclui uma identidade de sequência de aminoácidos da polimerase de RNA dependente de RNA (RdRP) inferior a 95% (Sasaya et al., 2023). O genoma dos coguvírus é composto por dois segmentos; o RNA1 codifica a proteína L, que contém o domínio da RdRp, enquanto o RNA2 adota uma estratégia de codificação ambisenso. As duas ORFs do RNA2, N e MP, são separadas por uma região intergênica não codificadora, que potencialmente forma uma estrutura longa de haste-alça rica em A/U (Zhang et al., 2021). Ambos os segmentos apresentam extremidades 5' e 3' conservadas e complementares, favorecendo a formação de uma estrutura secundária conhecida como "panhandle" essencial para a replicação viral desses vírus (Navarro et al., 2018a; 2018b; Zhang et al., 2021). Esta estrutura é formada por um sinal putativo de transcrição terminal (TTS), reconhecido pelo motivo 'CUCUGCU' em ambas as orientações da fita de RNA (Zhang et al., 2021).

2.9 *Coguvirus citrulli* e *Coguvirus henanense* (WCLaVs)

Os WCLaVs foram identificados na China (Xin et al., 2017), nos Estados Unidos (Hernandez et al., 2021), Austrália (Mulholland et al. 2023 e Brasil, onde causam sintomas graves, frequentemente associados à infecção por GRSV (Maeda et al., 2021). Nas plantações, os sintomas incluem epinastia, distorção das folhas e amarelecimento das nervuras (Maeda et al., 2021) (Figura 2). Embora a transmissão mecânica dos vírus tenha sido sugerida (Xin et al., 2017), os mecanismos específicos de transmissão e os possíveis vetores ainda não foram completamente esclarecidos.



Figura 1. Folhas de melancia com sintomas causados por infecção mista de isolados de *Coguvirus citrulli*, *Coguvirus henanense* (WCLaVs) e *Orthotospovirus arachianuli* (GRSV) em Juazeiro-BA, 2019.

Algumas características específicas desses vírus são o RNA1 do WCLaV1 e 2 possui 6,636 nt e 6,681 nt, respectivamente. A ORF1 dos WCLaVs, codifica a RdRp, apresenta seis motivos conservados (motivos A–E e o pré-motivo A): o motivo **A** (DATKWC), o motivo **B** (QGILHYTSS) e o motivo **D** (KS). O motivo **C** inclui a sequência SDD (ao invés de GDD), o tetrapeptídeo E (F / Y) xS do motivo **E** e três resíduos básicos (K, R e R / K) no **pré-motivo A** e um ácido glutâmico (E) a jusante do pré-motivo A, conservados para membros da ordem *Bunyavirales*, sendo o formato de partícula ainda é desconhecido para as espécies virais (Xin et al., 2017; Zhang et al., 2021).

Os WCLaVs foram relatados inicialmente apresentando três segmentos de RNA (Xin et al., 2017). No entanto, a partir de novas análises de high throughput-sequencing (HTS) e sequenciamento por sanger foi demonstrado que ambos apresentam apenas dois segmentos de RNA, RNA1 e RNA2 (Xin et al., 2017), sendo apenas o RNA2 bicistrônico e ambisenso (Zhang et al., 2021). O RNA2 dos vírus apresenta 2.717 nt (WCLaV-1) e 2.704 nt (WCLaV-2) (Figura 3), que possui uma região intergênica de 404 nt para WCLaV-1 e 336 nt para WCLaV-2; uma região rica em U/A não traduzida adota uma

conformação de *hairpin*, separando as duas ORFs desse RNA, possibilitando a codificação da MP e N (Zhang et al., 2021).

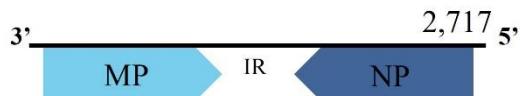
A

Coguvirus citrulli (watermelon crinkle leaf-associated virus 1, WCLaV-1)

RNA1 (MW842780)



RNA2 (MW751424)



B

Coguvirus henanense (watermelon crinkle leaf-associated virus 2, WCLaV-2)

RNA1 (MW842781)



RNA2 (MW751425)



Figura 2. Representação esquemática da organização genômica dos vírus (A) *Coguvirus citrulli* (WCLaV-1) e (B) *Coguvirus henanense* (WCLaV-2). RdRp (polimerase de RNA dependente de RNA); MP (proteína de movimento); N (proteína do nucleocapsídeo); IR (região intergênica).

Os terminais de cada RNA genômico de WCLaV-1 e -2 apresentam sequências de nucleotídeos complementares entre si, sendo de aproximadamente 20 nt; essa complementariedade facilita a formação de estrutura secundária “panhandle”, fenômeno importante para o processo de replicação de alguns vírus (Zhang et al., 2021).

3. Referências bibliográficas

- ADAMS, M. J.; HEINZE, C.; JACKSON, A. et al. Family Virgaviridae. In: King, A. M. Q.; Adams, M. J.; Carstens, E. B.; Lefkowitz, E. J. **Virus Taxonomy - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. International Union of Microbiological Societies – Virology Division. London: Elsevier, 8, 1462, 2012.
- ADAMS, M. J., ADKINS, S., BRAGARD, C. et al. ICTV virus taxonomy profile: Virgaviridae. *Journal of General Virology*, 98(8), 1999-2000, 2017.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, Fifth edition. Elsevier Academic Press, Amsterdam, the Netherlands. 2005.
- AGUIAR, R. W. S.; RODRIGUES, A.; PORTELLA, A. C. F.; LOPES, M. M.; LIMA, M. F.; RESENDE, R. O.; NAGATA, T. Serological identification of virus in watermelon production fields in the Tocantins state. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 58, n. 2, p. 192-197, 2015.
- AHLQUIST, P. & JANDA, M. cDNA cloning and in vitro transcription of the complete brom mosaic virus genome. *Molecular and Cellular Biology*, 4(12), 2876–2882, 1984.
- ANDRADE, I. A., FRANCA, L. V., KAUFFMANN, C. M., et al. Practical use of tobaviruses-based vector to produce SARS-CoV-2 antigens in plants. *Journal of Virological Methods*. 315:114710, 2023.
- ANGENENT, G. C.; POSTHUMUS, E.; BOL, J. F. Biological activity of transcripts synthesized in vitro from full-length and mutated DNA copies of tobacco rattle virus RNA 2. *Virology*, 173(1), 68–76, 1989.
- BALINT-KURTI, P. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology* 20(8):1163-1178, 2019.
- BATISTA, A.R.S., NICOLINI, C., RODRIGUES, K.B. MELO, F. L.; VASQUES, R. M.; MACÊDO, M. A.; INOUE-NAGATA, A. K., NAGATA, T. Unique RNA 2 sequences of two Brazilian isolates of Pepper ringspot virus, a tobaviruses. *Virus Genes* 49, 169–173. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1066-8>, 2014.
- BERGH, S.T.; KOZIEL, M.G.; HUANG, S.C.; THOMAS, R.A.; GILLEY, D.P.; SIEGEL, A. The nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA-2 (CAM strain). *Nucleic Acids Research*, v.13, p.8507, 1985.
- BIGEARD, J.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant*, 8(4), 521-539, 2015.
- BLAWID, R., NAGATA, T. Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly. *Journal of Virological Methods*. 222, 11-15, 2015.

BOARI, A. de J. et al. Doenças em hortaliças cultivadas na Região Metropolitana de Belém. **Embrapa Amazônia Oriental-Fólder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**, 2017.

CADMAN, C. H. & HARRISON, B. D. Studies on the properties of soil-borne viruses of the tobacco-rattle type occurring in Scotland. **Annals of Applied Biology**, 47, 542-556, 1959.

CHAVES, P. P. N. et al. Caracterização físico-química e sensorial de famílias de melancia tipo crimson sweet selecionadas para reação de resistência a potyvirus. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n.4, p. 120–125, 2013.

CHEN, Y.Y.; LIN, Y.M.; CHAO, T.C.; WANG, J.F.; LIU, A.C.; HO, F.I.; CHENG, C.P. Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. **Physiologia Plantarum**. 136: 324–335, 2009.

DIAZ-LARA, A. et al. Two novel negative-sense RNA viruses infecting grapevine are members of a newly proposed genus within the family phenuiviridae. **Viruses**, v. 11, n. 8, 2019.

EPPO. Article 7765. EPPO Global Database, 2024. Disponível em: <https://gd.eppo.int/reporting/article-7765>. Acesso em: 21 jan. 2025

FAOSTAT/FAO. Divisão de Estatística da FAO/Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Disponível em: <www.fao.org/faostat/en/#data/QC> Consultado em 15 de setembro de 2024.

FOGAÇA, M. B. T.; LOPES-LUZ, L.; SAAVEDRA, D. P. et al. Production of antigens expressed in *Nicotiana benthamiana* plant and *Escherichia coli* for the SARS-CoV-2 IgG antibody detection by ELISA. **Journal of Virological Methods**, 114969, 2024.

GARCIA-RUIZ, H. Host factors against plant viruses. **Molecular Plant Pathology** 20(11):1588-1601, 2019.

GHAZALA, W.; WALTERMANN, A.; PILOT, R.; WINTER, S.; VARRELMANN, M. Functional characterization and subcellular localization of the 16K cysteine-rich suppressor of gene silencing protein of tobacco rattle virus. **Journal of General Virology**, v.89, p.1748–1758, 2008.

GIBSON, Daniel G. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature methods**, v. 6, n. 5, p. 343-345, 2009.

GOULDEN, M.G.; LOMONOSSOFF, G.P.; DAVIES, J.W.; WOOD, K.R. The complete nucleotide sequence of PEBV RNA2 reveals the presence of a novel open reading frame and provides insights into the structure of tobaviral subgenomic promoters. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.4507, 1990.

HAMILTON, William DO; BAULCOMBE, David C. Infectious RNA produced by in vitro transcription of a full-length tobacco rattle virus RNA-1 cDNA. **Journal of General Virology**, v. 70, n. 4, p. 963-968, 1989.

HARRISON, B. D., & ROBINSON, D. J. The tobaviruses. **Advances in Virus Research**, 23, 25–77, 1978.

HEFFERON, K. L. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. **Virology**, v. 433, n. 1, p. 1-6, 2012.

HELLENS, R.; MULLINEAUX, P.; KLEE, H. Technical Focus: a guide to Agrobacterium binary Ti vectors. **Trends in Plant Science**, 5(10), 446–451, 2000.

HENDRICKS, K. E., HERNANDEZ, R. N., ROBERTS, P. D., ISAKEIT, T., ALABI, O. J. First report of watermelon crinkle leaf-associated virus 1 (WCLaV-1) and WCLaV-2 in watermelon (*Citrullus lanatus*) plants coinfecte with cucurbit chlorotic yellows virus in Florida. **Plant Disease**. 106, 339, 2022.

HERNÁNDEZ, C.; MATHIS, A.; BROWN, D. J.; BOL, J. F. Sequence of RNA 2 of a nematode-transmissible isolate of tobacco rattle virus. **The Journal of General Virology**, 76 (Pt 11), 2847–2851, 1995.

HERNANDEZ, R. N. et al. First report of watermelon crinkle leaf-associated virus 1 (WCLaV-1) and WCLaV-2 infecting watermelon (*Citrullus lanatus*) in the United States. **Plant Disease**, n. ja, 2021.

HERRERA-ESTRELLA, L.; BLOCK, M. D.; MESSENS, E.; HERNALSTEENS, J. P.; MONTAGU, M. V.; SCHELL, J. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. **The EMBO Journal**, 2(6), 987–995, 1983.

HOWDEN, A. J. & HUITEMA, E. Effector-triggered post-translational modifications and their role in suppression of plant immunity. **Frontiers in Plant Science**, 3, 160, 2012.

HUANG, W.; ZHANG, Y.; XIAO, N.; ZHAO, W.; SHI, Y.; FANG, R. Trans-complementation of the viral movement protein mediates efficient expression of large target genes via a tobacco mosaic virus vector. **Plant Biotechnology Journal**, v. 22, p.11, 2024.

HUGHES, G.; DAVIES, J.W.; WOOD, K.R. In vitro translation of the bipartite genomic RNA of pea early browning virus. **Journal of General Virology**, v.67, p.2125–2133, 1986.

HULL, R. **Plant virology**. Elsevier Academic Press, London, UK. 2014.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia** 2023. – Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/14/10340> Consultado em: 14 de janeiro de 2025.

ICTV. **INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES**. 2025. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/>. Acessado em: 19 de janeiro de 2025.

KITAJIMA, E.W.; OLIVEIRA, A.R.; COSTA, A.S. 1969. Morfologia das partículas do vírus do anel do pimentão. **Bragantia**, v.28, p.1–22.

KITAJIMA, E. W. An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). **Biota Neotropica**, 20, e20190932, 2020.

KJEMTRUP, S. et al. Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. **The Plant Journal**, v. 14, n. 1, p. 91-100, 1998.

KUMAGAI, M. H. et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 5, p. 1679-1683, 1995.

LAMBERT, R. A. et al. Mulching é uma opção para o aumento de produtividade da melancia. **Journal of Neotropical Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 53–57. 2017.

LEÃO, E. U. et al. *Citrullus lanatus* is a new natural host of Groundnut ringspot virus in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 163, n. 11-12, p. 1014-1018, 2015.

LIMA, M. F. **Cultura da melancia**. Embrapa Hortaliças-Livro técnico (INFOTECA-E), 2014.

LINDBO, J. A. TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. **Plant Physiology**, 145(4), 1232-1240, 2007.

LIU, Y.; WANG, S.; LIU, X. et al. Agrobacterium-mediated transient expression in *Torreya grandis* cones: A simple and rapid tool for gene expression and functional gene assay. **Scientia Horticulturae**, 338, 113664, 2024.

MACFARLANE, S. A.; GILMER, D.; DAVIES, J. W. 1992. Efficient inoculation with CaMV 35 S promoter-driven DNA clones of the tobaviruses PEBV. **Virology**, 187(2), 829–831. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90488-b](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90488-b).

MACFARLANE, S. A.; BROWN, D. J. F.; BOL, J. F. The transmission by nematodes of tobaviruses is not determined exclusively by the virus coat protein. **European Journal of Plant Pathology**, 101, 535-539, 1995.

MACFARLANE, S. A. WALLIS, C. V.; BROWN, D. J. Multiple virus genes involved in the nematode transmission of pea early browning virus. **Virology**, 219(2), 417–422, 1996.

MACFARLANE, S. A. Molecular biology of the tobaviruses. **Journal of General Virology**, 80(11), 2799-2807, 1999.

MACFARLANE, S. A. Tobaviruses- plant pathogens and tools for biotechnology. **Molecular Plant Pathology**, 11(4), 577-583, 2010.

MACHO, A. P. & ZIPFEL, C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. **Molecular Cell**, 54(2), 263–272, 2014.

MAEDA, M. H. K., KOYAMA, L. H. H., CAMPOS, R. N. S., et al. First report of watermelon crinkle leaf-associated virus 1 and 2 infecting watermelon (*Citrullus lanatus*) plants in Brazil. **Plant disease**, 106(2), 773, 2022.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, A. M.; BAULCOMBE, D. C. Tobacco Rattle Virus 16-Kilodalton Protein Encodes a Suppressor of RNA Silencing That Allows Transient Viral Entry in Meristems. **Journal of Virology**, v.82, p.4064–4071, 2008.

MULHOLLAND, S., WILDMAN, O., KINOTI, W. M. et al. First report of watermelon crinkle leaf associated virus-1 (WCLaV-1) in watermelon (*Citrullus lanatus*) in Australia. **Journal of Plant Pathology**, 105(1), 295-297, 2023.

NAGATA, T. et al. The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. **Plant Pathology**, v. 53, n. 2, p. 136–140., 2004.

NAVARRO, B. et al. The first phlebo-like virus infecting plants: a case study on the adaptation of negative-stranded RNA viruses to new hosts. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 5, p. 1075–1089., 2018a.

NAVARRO, B. et al. A negative-stranded RNA virus infecting citrus trees: The second member of a new genus within the order bunyavirales. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, p. 1–11. 2018b.

NGOU, B. P, JONES, J. D, DING, P. Plant immune networks. **Trends in Plant Science**, 27(3):255-73, 2022a

NGOU, B. P. M.; DING, P.; JONES, J. D. Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. **The Plant Cell**, 34(5), 1447-1478, 2022b.

NORKUNAS, K. et al. Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. **Plant Methods**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2018.

OBEMBE, O. O. et al. Advances in plant molecular farming. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p. 210-222, 2011.

OFFORD, R. E. Electron microscopic observations on the substructure of tobacco rattle virus. **Journal of Molecular Biology**, 17(2), 370–375, 1966.

PENNEY, Claire A. et al. Plant-made vaccines in support of the Millennium Development Goals. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 5, p. 789-798, 2011.

RATCLIFF, F. et al. Technical advance: tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. **The Plant Journal**, v. 25, n. 2, p. 237-245, 2001.

RAMOS, N. F.; LIMA, J. A. A.; GONÇALVES, M. F. B. Efeitos da interação de potyvirus em híbridos de meloeiro, variedades de melancia e abobrinha. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 199-203, 2003.

ROBINSON, D. J. 1983. RNA Species of Tobacco Rattle Virus Strains and Their Nucleotide Sequence Relationships. **Journal of General Virology**, v.64, p.657–665.

RODRIGUES, K. B.; ORÍLIO, A. F.; BLAWID, R.; MELO, F.L.; NAGATA, T. Subcellular localization of p29, a putative movement protein of pepper ringspot virus. **Archives of Virology**, 160:359-64, 2015.

RUIZ, M. T. et al. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. **The Plant Cell**, v. 10, n. 6, p. 937-946, 1998.

SÄNGER, H. L. Functions of the two particles of tobacco rattle virus. **Journal of Virology**, 3(3), 304–312, 1969.

SANTOS, G., ZAMBOLIM, L., COSTA, H., CAFÉ-FILHO, A. C. 2011. **Doenças fúngicas, bacterianas e abióticas**. Pages 95-150 in: Tecnologias para produção sustentável da melancia no Brasil. G. R. Santos and L. Zambolim, eds. Suprema Gráfica e Editora LTDA, Visconde do Rio Branco, Brazil.

SASAYA, T.; PALACIOS, G.; BRIESE, T.; et al. (ICTV virus taxonomy profile: Phenuiviridae 2023. **Journal of General Virology**, 104(9), 001893, 2023.

SILBERSCHMIDT, K. Studies on a Brazilian Tomato ringspot disease. **Phytopathologische Zeitschrift**, vol. 46, No. 3, 209-229 pp.,1963.

SWANSON, M.; BARKER, H.; MACFARLANE, S.A. Rapid vascular movement of tobaviruses does not require coat protein: evidence from mutated and wild-type viruses. **Annals of Applied Biology**, 141, 259-266, 2002.

TATEDA, C., ZHANG, Z., SHRESTHA, J., JELENSKA, J., CHINCHILLA, D., GREENBERG, J. T. Salicylic acid regulates Arabidopsis microbial pattern receptor kinase levels and signaling. **The Plant Cell** 26(10):4171-4187, 2014.

TAVARES-ESASHIKA, M.; CAMPOS, R.; BLAWID, R.; LUZ, L.; INOUE-NAGATA, A.; NAGATA, T. Characterization of an infectious clone of pepper ringspotvirus and its use as a viral vector. **Archives of Virology**. 165:367–375, 2020.

TAVARES-ESASHIKA, M.L. TESE: **CONSTRUÇÃO DO CLONE INFECCIOSO E VETOR VIRAL DE PEPPER RINGSPOT VIRUS**. 2021. 114p. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.

TAVARES-ESASHIKA, M. L.; CAMPOS, R. N. S.; MAEDA, M. H. K.; KOYAMA, L. H. H.; HAMANN, P. R. V.; NORONHA, E. F.; NAGATA, T. Development of a heterologous gene expression vector in plants based on an infectious clone of a tobavirus, pepper ringspot virus. **Annals Of Applied Biology**, v. 181, n. 1, p. 107-116, 2022.

TYURIN, A. A.; SUHORUKOVA, A. V.; KABARDAEVA, K. V.; GOLDENKOVA-PAVLOVA, I. V. Transient gene expression is an effective experimental tool for the research into the fine mechanisms of plant gene function: advantages, limitations, and solutions. **Plants**, 9(9), 1187, 2020.

VASSILAKOS, N.; VELLIOS, E.K.; BROWN, E.C.; BROWN, D.J.F.; MACFARLANE, S.A. Tobavirus 2b protein acts in trans to facilitate transmission by nematodes. **Virology**, v.279, p.478–487, 2001.

VAN GRIETHUYSEN, P. A.; REDEKER, K. R.; MACFARLANE, S. A.; NEILSON, R.; HARTLEY, S. E. Virus-induced changes in root volatiles attract soil nematode vectors to infected plants. **New Phytologist**, 241(5), 2275-2286, 2024.

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** 66(10):2839-2856, 2015.

XIN, M. et al. Two negative-strand RNA viruses identified in watermelon represent a novel clade in the order Bunyavirales. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1514, 2017.

XU, Y., ZHANG, S., ZHANG, M., JIAO, S., GUO, Y., JIANG, T. The role of reactive oxygen species in plant-virus interactions. **Plant Cell Reports**, 43(8), 197, 2024.

YODA, H.; YAMAGUCHI, Y.; SANO, H. Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. **Plant Physiology**, 132(4), 1973-1981, 2003.

YU, X. Q.; NIU, H. Q.; LIU, C.; WANG, H. L.; YIN, W.; XIA, X. PTI-ETI synergistic signal mechanisms in plant immunity. **Plant Biotechnology Journal**, 22:8, 2024.

ZAMBRYSKI, P. JOOS, H.; GENETELLO, C. LEEMANS, J.; MONTAGU, M. V.; SCHELL, J. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **The EMBO journal**, 2(12), 2143–2150, 1983.

ZHANG, S. et al. Watermelon crinkle leaf-associated virus 1 and watermelon crinkle leaf-associated virus 2 have a bipartite genome with molecular signatures typical of the members of the genus Coguvirus (family Phenuiviridae). **Archives of Virology**, n. 0123456789, p. 3–8, 2021.

ZHANG, Y.; QIU, L.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; FU, C.; DAI, S.; SUN, M. A high-efficiency transient expression system mediated by agrobacterium tumefaciens in spinacia oleracea leaves. **Plant Methods**, 20(1), 100, 2024.

WANG, Y.; BOUWMEESTER, K.; VAN DE MORTEL, J.E.; SHAN, W.; GOVERS, F. A novel Arabidopsis-oomycete pathosystem: Differential interactions with Phytophthora capsici reveal a role for camalexin, indole glucosinolates and salicylic acid in defence. **Plant, Cell & Environment**. 36: 1192–1203, 2013.

**CAPÍTULO 1: SPECIFIC ANTIBODY PRODUCTION USING RECOMBINANT
PROTEINS TO ELUCIDATE SEED TRANSMISSION AND NUCLEAR
LOCALIZATION OF *Coguvirus citrulli* AND *Coguvirus henanense* IN
RADICLES OF WATERMELON CROP**

Este capítulo foi publicado de forma modificada na revista *Journal of Virological Methods*. Kauffmann, C.M., Vendramini, M., Batista, A.M.V., Mota, H.B.S., Andrade, I.A., Cárdenas, S.B.S., Queiroz, P.S., Silva, B.A., Correa, J.R., Nagata, T.: **Specific antibody production using recombinant proteins to elucidate seed transmission and nuclear localization of *coguvirus citrulli* and *coguvirus henanense* in radicles of watermelon crop.** <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2024.114886>

Specific antibody production using recombinant proteins to elucidate seed transmission and nuclear localization of coguvirus citrulli and coguvirus henanense in radicles of watermelon crop.

Abstract

Coguvirus citrulli and *C. henanense* (WCLaV-1 and WCLaV-2, respectively), both belonging to the genus *Coguvirus* within the family *Phenuiviridae*, have been identified in watermelon plants in Brazil. To understand the biological characteristics of these viruses, we produced specific and high-titer antibodies in order to study seed transmission and tissue tropism. The nucleocapsid (N) proteins of WCLaV-1 and -2 were produced using the pepper ringspot virus vector for the antibody production. The N protein genes and the vector backbone were prepared by (RT-)PCR and ligated by Gibson assembly. The constructs were agro-infiltrated in *N. benthamiana* plants. The expressed N proteins were purified using affinity chromatography and used to immunize rabbits for polyclonal antibody production. The specificity of both antibodies was confirmed by dot-immunobinding assay, antigen-coating ELISA, tissue-blot immunobinding assay and Western blot. The antibodies were produced and demonstrated to be specific, with no or slight cross-reactions observed. These antibodies were used to test seed transmission of these viruses. By antigen-coating ELISA, WCLaV-1 showed 93.1% of seed-transmission in a watermelon cultivar ‘Crimson Sweet’, while WCLaV-2 showed only 17.8%. The N protein of WCLaV-1 was mainly detected in the cytoplasm of the seed tissues. Remarkably, it was also found in the nuclei of the radicle, as confirmed by confocal laser microscopy.

Keywords: *Coguvirus*, seed-transmission, antigen-coating ELISA, Immunolabeling

1. Introduction

Watermelon crinkle leaf-associated virus 1 (WCLaV-1, *Coguvirus citrulli*) and watermelon crinkle leaf-associated virus 2 (WCLaV-2, *Coguvirus henanense*), genus *Coguvirus*, were first reported in watermelon plants in China (Xin et al., 2017). In the United States, these viruses were reported in Texas (Hernandez et al., 2021), Georgia (Adeleke et al., 2022), in coinfection with cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV) in Florida (Hendricks et al., 2022) and in Australia (Mulholland et al., 2023). In Brazil, WCLaV-1 and -2 have been reported in watermelon plants, co-infecting *Orthotospovirus arachianuli* (groundnut ringspot virus, GRSV) (Maeda et al., 2022). The symptoms caused by these viruses in the field include leaf curling, distortion and vein clearing/yellowing, which are more severe when co-infected with other viruses (Hendricks et al., 2022, Maeda et al., 2022, Mulholland et al., 2023).

WCLaV-1 and -2 possess a bi-segmented genome consisting of negative/ambisense, single-stranded RNA. RNA1 and RNA2 comprise approximately 6.6kb and 2.7kb in length, respectively. RNA1 is monocistronic and encodes a putative RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) protein. RNA2 is ambisense and bicistronic, containing two ORFs that encode the movement protein (in a positive sense) and the nucleocapsid (N) protein (in a negative sense), separated by a non-coding intergenic region (Xin et al., 2017, Zhang et al., 2021). The percentage of RdRp amino acid identity between WCLaV-1 and -2 was 58.8% (Zhang et al., 2021), which was below the species demarcation border of 95% in this protein.

Normally, virus detection in field-collected plant materials is often performed using serological methods, as they are more accessible to test many samples (Agrios, 2005) than reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCR). Specific antiserum is also useful for studying virus spread in plants and subcellular localization by

immunolabelling microscopy. Antisera specific for viral structural proteins are normally produced by immunizing rabbits or mice with purified plant virus particles (Souiri et al., 2014). However, the preparation of purified virus for antiserum production is impaired in some cases due to difficulties in virus isolation, the preparation of infected plants with a single isolate, and low virus titer in plants (Hull, 2014). Isolation of the viruses in this study was difficult because of the mixed infection of WCLaV-1, WCLaV-2, and GRSV, lack of indicator plants to induce local lesions for virus isolation and the lack of information about the transmission vectors for WCLaVs. Therefore, preparation of recombinant N proteins of WCLaVs using the pepper ringspot virus (PepRSV) vector for antiserum production was planned to facilitate antibody production. Based on our experience, antisera raised with antigens prepared through the *Escherichia coli* system did not exhibit sufficient quality for use in standard serological assays. This virus vector has already been employed to produce green fluorescent protein as a reporter gene and human virus antigens (Tavares-Esashika et al., 2022, Andrade et al., 2023). However, antibodies against plant virus antigens prepared through this vector system have not yet been employed. The objective of this study was to establish the utilization of the PepRSV vector in producing distinct antigens of WCLaVs for the specific antibody production.

Using these specific antibodies, our aim was to establish the ELISA protocol for routine serological diagnosis. Additionally, during the study, we began to suspect the seed transmission of WCLaVs, as suggested by another group (Mulholland et al., 2023). The specific antibody produced in this study was used to confirm the seed transmission of the viruses and to study the subcellular localization of WCLaV-1 within the seeds by confocal microscopy.

2. Materials and methods

2.1 Cloning of N genes to pepper ringspot virus vector

In May 2019, watermelon leaves exhibiting severe symptoms of leaf curling, distortion and vein yellowing were collected from Juazeiro, Bahia state, Brazil. Total RNA was extracted from the leaves using Trizol® reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), and SuperScript™ IV (Thermo Fisher Scientific) was used for complementary DNA synthesis. PCR was performed using specific primers for the *N* genes of WCLaV-1 and -2: WCLaV-1-N-For and WCLaV-1-N-Rev; WCLaV-2-N-For and WCLaV-2-N-Rev (primer sequences are in Supplementary Table 1). The viral vector based on PepRSV was used in this study and amplified using primers, RNA2_Backbone_For and RNA2-noCP_Rev (Supplementary Table 1), as described by our research group (Tavares-Esashika et al., 2020, Tavares-Esashika et al., 2022, Andrade et al., 2023). The vector has two RNA genome segments, and the WCLaV-1 and WCLaV-2 *N* genes were cloned into the vector containing RNA2 segment, named RNA2-N1 and RNA2-N2 (Fig. 1), respectively. The complete *N* gene of the WCLaV-1 and -2 and the expression vector PepRSV backbones were amplified by PCR using Q5 High Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA). A hexahistidine-tag sequence was added to the 3' end of the *N* genes for protein detection and purification. The amplicons were purified using the Gel Band Purification Kit (Cytiva, Marlborough, USA) according to the manufacturer's instructions. Purified fragments were assembled using the NEBuilder HiFi DNA Assembly master mix (New England Biolabs) (Blawid and Nagata, 2015, Tavares-Esashika et al., 2020) according to the manufacturer's instructions. *Escherichia coli* cells (DH10B strain, Thermo Fisher Scientific) were transformed with the construct by electroporation. The plasmids were purified using Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, USA) and sequenced using Sanger method.

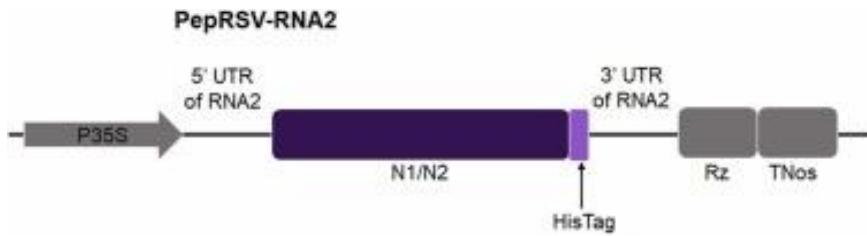


Fig. 1. T-DNA regions of the N1 and N2 constructs in RNA2 segment of the PepRSV viral vector. Original *CP* gene region of PepRSV was substituted with *N* gene of WCLaV. P35S, cauliflower mosaic virus 35S protein promoter; UTR, untranslated region; HisTag, hexahistidine sequence, Rz: hepatitis delta virus ribozyme; TNos: Nopaline synthase terminator.

2.2 Agroinfection in *Nicotiana benthamiana* plants and transient expression

Agrobacterium tumefaciens GV3101:pMP90 cells were transformed by electroporation using the RNA2-based constructs described above. *A. tumefaciens* cells with the selected RNA2 clones, as well as cells with RNA1 (mixed with 1:1), were prepared and agro-infiltrated to plants according to Tavares-Esashika et al. (2020), Tavares-Esashika et al. (2022). At four days post-agroinfiltration (d.p.i.), *N. benthamiana* leaves were collected and stored in a freezer at -80 °C. A preliminary evaluation of recombinant N proteins production in leaves was performed by Western blot using anti-HisTag monoclonal antibody (0.33 µg/ml in PBS pH 7.4) (Sigma-Aldrich, San Luis, USA) and the anti-mouse IgG (H+L)-alkaline phosphatase conjugate (0.33 µg/ml in PBS solution) (Thermo Fisher Scientific) as the secondary antibody. Reaction was developed with NBT/BCIP substrates.

After confirming N1 and N2 protein production, vacuum agroinfiltration of whole *N. benthamiana* plants on a larger scale was carried out as described by Andrade et al. (2023) to purify enough N proteins for polyclonal antiserum production in rabbits. At four d.p.i., the leaves were stored in a freezer at -80 °C.

2.3 Purification of recombinant N proteins

Frozen leaves were ground using liquid nitrogen and the extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 30 mM Imidazole, 0.2% Triton X-100, pH 7.1) with PMSF

(final 1 mM) and β -mercaptoethanol (2 mM) was added at a ratio of 1:5 (w/v, sample/buffer). The clarified supernatant was obtained by centrifugation at 10,000g for 20 min at 4 °C. Affinity chromatography was performed using a HisPur Ni-NTA (Thermo Fisher Scientific). To determine the most stringent washing conditions, a range of imidazole concentrations (60–500 mM) was used for washing and elution. The presence of the N protein in each fraction was verified using SDS-PAGE with silver staining and Western blot. After determining the washing conditions, three washing steps were performed with an imidazole concentration of 150 mM for N1 and 250 mM for N2 proteins in washing buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, pH 7.1). For total protein elution, a buffer containing 500 mM imidazole was used. For protein concentration and desalinization, the eluted solution was centrifuged in Amicon® Ultra-15 Centrifugal filter tubes (30 kDa cut-off; Millipore, Burlington, USA) for 40 min at 4,000 g at 12 °C and the centrifugation was repeated after adding 1 × PBS. The purity and integrity of the proteins were evaluated by SDS-PAGE and Western blot and the protein concentration was determined using the Bradford method (Bradford, 1976).

2.4 Production and purification of polyclonal antisera

Purified N1 and N2 proteins were used as antigens and injected to two healthy rabbits (New Zealand white). Three injections (0.35 mg of antigen each) were administered to the rabbits at three-week intervals with Freund's adjuvant (BD, New Jersey, USA) 1:1 (v/v). The use of rabbit for immunization was permitted by the Institutional Animal Care and Use Committee (number 23106.043619/2020–88). Bleeding was carried out one week after the third immunization and antisera were stored in a freezer at –20 °C. Antibody was semi-purified by precipitation with ammonium sulfate, dialyzing solution with nitrocellulose tubes (Dialysis Tubing, Sigma-Aldrich) and

chromatography with DEAE SephadexTM (Cytiva, Marlborough, USA) column. The concentration of antibodies was measured using Bradford assay.

2.5 DIBA, antigen-coating ELISA and Western blot

Dot immunobinding assay (DIBA) was performed to detect purified recombinant N1 and N2 proteins, using different concentrations (0.001 µg; 0.01 µg; 0.1 µg; 1 µg per dot) and for field-collected leaf samples of watermelon according to Ali et al. (2012) with some modifications. Eight watermelon leaf samples were ground and diluted at 1:20, 1:40, and 1:80 (w/v) in PBS (pH 7.4), including positive (purified N proteins) and negative (healthy plant) controls and three replicates were performed. Samples were centrifuged at 10,000 g for 5 min and the supernatant was applied to nitrocellulose membrane (0.45 µm pore, Cytiva). Membranes were immersed in a blocking solution (1 × PBS containing 2% skim milk) for 30 min under agitation. Due to the cross-reaction of anti-N2 antiserum to N1 protein, the cross-adsorption for removal of antibodies specific to N1 protein was performed. The plant sap of *N. benthamiana* leaves in which N1 gene expressed was added in the solution containing anti-N2 antiserum and incubated with agitation for 1 h before use. Semi-purified polyclonal antibodies produced against WCLaV-1 and -2 were diluted in PBS-T (1 µg/ml) and incubated with the membranes for 1 h. After washing, membranes were incubated with anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate (0.33 µg/ml) (Sigma-Aldrich) for 1 h and developed as described above.

Antigen-coating ELISA was performed in Nunc MaxiSorpTM 96 well plates (Thermo Fisher Scientific), which were coated with 100 µL of eight plant extracts diluted to 1:20, 1:40 and 1:80 in PBS (each diluted sample was tested in triplicate), using the same samples for DIBA and incubated overnight at 4 °C. For the negative controls, watermelon plants of the cultivar ‘Talisman’ were used since it was the only cultivar free

from WCLaV contamination in seeds. The plates were washed with PBS-T and blocked with 100 µL PBS-T and 2% skim milk for 1 h at 37 °C. For the assay using anti-N2 antibody, cross-adsorption with WCLaV-1 antigen was performed as described above. Anti-N1 and anti-N2 antibodies diluted (1 µg/ml) in PBS-T with 2% skim milk were added to wells and the ELISA plates were incubated for 1 h. After washing, the plates were incubated with anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate (0.33 µg/ml) (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37 °C. After four washes with PBS-T, ρ -nitrophenyl phosphate substrate solution was added and the absorbance was measured at 405 nm.

Western blot was performed for field-collected watermelon samples using the same samples used for DIBA and antigen-coating ELISA, with anti-N1 and anti-N2 antibodies (1 µg/ml) as the primary antibodies and anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate (0.5 µg/ml) (Sigma-Aldrich) as secondary antibody.

2.6 RT-PCR

Total RNA was extracted from the watermelon leaves of the same samples used in DIBA, Western blot and antigen-coating ELISA, using Trizol® reagent (Thermo Fisher Scientific), and SuperScript™ IV (Thermo Fisher Scientific) was used for cDNA synthesis. PCR was performed using specific primers, WCLaV-1vNP / WCLaV-1cMP and WCLaV-2vNP / WCLaV-2cMP (Hernandez et al., 2021, Supplementary Table 1), for the N genes of WCLaV-1 and -2, respectively.

2.7 Tissue blot immunobinding assay

Tissue blot immunobinding assay (TBIA) was conducted using freshly cut surfaces of seeds and seedlings of watermelon cv. ‘Crimson sweet’, obtained commercially, which

were blotted onto nitrocellulose membranes. Immunoassays were conducted as the same conditions described in Western blot procedure.

2.8 Antigen-coating ELISA using seedlings for WCLaV-1 and -2 detection

Seeds of watermelon cv. ‘Crimson sweet’, obtained commercially, were sown, and maintained in a growth chamber (Panasonic, Osaka, Japan). The negative control was cv. ‘Talisman’. Leaf samples were collected two weeks after germination. Total of 259 watermelon seedlings were tested by antigen-coating ELISA against WCLaV-1 and -2, using the protocol described above. The minimum threshold for positive ELISA values was the average of the readings of three uninfected watermelon plants plus three times the standard deviation (Clark et al., 1986). The antigen-coating ELISA was performed using two additional watermelon cvs. ‘Sugar baby’ and ‘Fairfax’, using 40 watermelon seedlings each.

2.9 Confocal laser scanning microscopy

The immunolabeling microscopy was conducted on the leaf and seed embryonic tissues and three repetitions was performed. To simplify the interpretation, we observed the presence of WCLaV-1 using only anti-N1 antibody in watermelon tissues. First, the infected (cv. ‘Crimson sweet’) and uninfected (cv. ‘Talisman’) watermelon samples were fixed in 4% paraformaldehyde and incubated overnight at 4 °C. After three washes with PBS-T, tissue cross-sections (20–40 nm) blocked in 5% low-melting agarose (Promega) were prepared using a Leica VT1000 S vibratome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Sectioned samples were blocked with PBS containing 10% bovine serum albumin (BSA) and 1% Triton X-100 for 1 h. Anti-N1 antibody was diluted in PBS-10% BSA (1 µg/ml) and incubated with the samples for 1 h. Samples were washed with PBS-T and incubated with anti-rabbit secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488

(Thermo Fisher Scientific), diluted 1:3000 (0.33 µg/ml) for 30 min. After washing, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific) were added to the samples for mounting. A confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP5, Leica Microsystems) was used for analyses. The excitation wavelengths were 405 nm, 488 nm, and 633 nm. Fluorescence was recorded at 440 nm (DAPI), 500–600 nm (Alexafluor488) and 650–750 nm (chlorophyll). To improve the image quality, they were processed using Adobe Photoshop (2020–2023) using brightness/contrast.

3. Results

3.1 Expression and purification of N proteins and evaluation of the specificity and sensitivity of polyclonal antisera

N1 and N2 protein production in the agro-infiltrated leaves was confirmed by Western blot using anti-HisTag antibody. The protein bands reacted with anti-HisTag antibody was confirmed with the size of approximately 40 kDa (the expected size), in Western blot analysis for both proteins (data not shown). After the stringency determination test, imidazole concentrations of 150 mM and 250 mM were chosen for resin washing for the purification of recombinant N1 and N2 proteins, respectively. They showed a significantly pure profile, as analyzed by electrophoresis with silver staining (Fig. 2). The purified N1 protein showed a single prominent protein band at the expected size (40 kDa) in both SDS-PAGE and Western blot, whereas N2 showed extra bands in addition to the expected one. Some of these bands reacted with anti-HisTag, indicating possible fragmentation of N2 proteins (Fig. 2A, B). The purified proteins yielded 1.25 mg of N1 protein and 3.5 mg of N2 protein per 80 g of fresh leaves. Polyclonal antisera raised with the purified N1 and N2 proteins were used in the DIBA format (Fig. 2C) to evaluate the specificity and sensitivity of these two antisera/antigens. The N1 antiserum showed high specificity for the purified N1 antigen, but was not reactive to purified N2 antigen

and was sensitive for detecting 1 ng of antigen per dot (Fig. 2C). The N2 antiserum also showed high sensitivity to the N2 antigen detecting 1 ng per dot. However, a cross-reaction to N1 antigen was also observed at a much lower intensity (Fig. 2C).

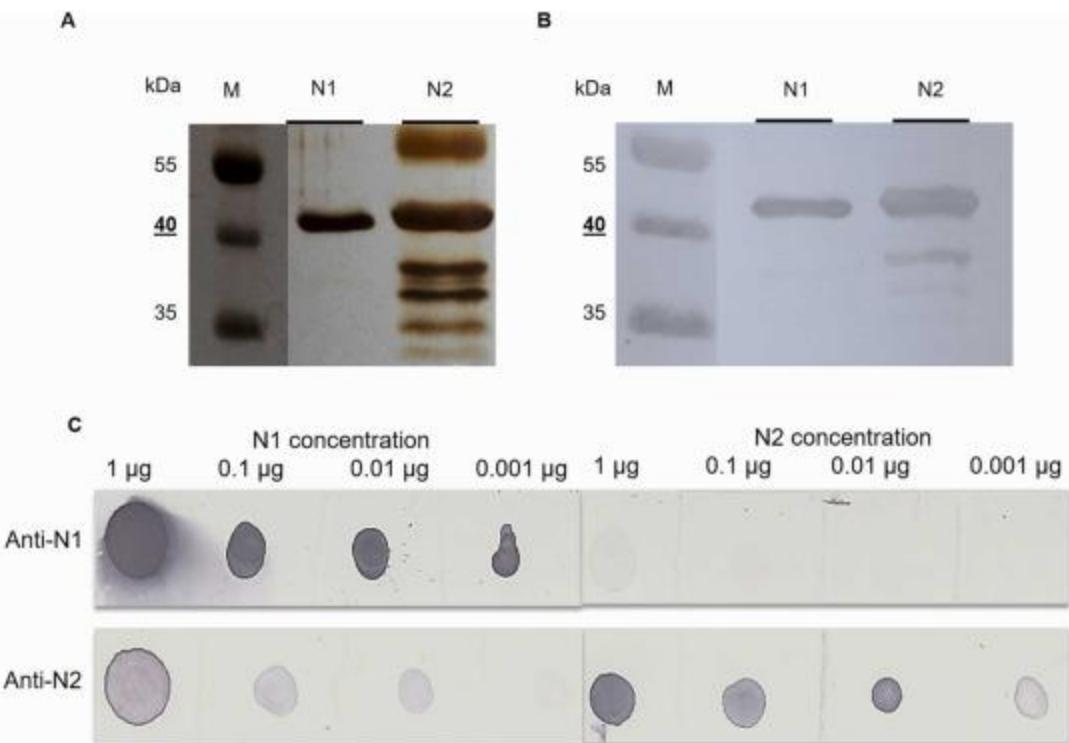


Fig. 2. Electrophoresis, Western blot of the purified N proteins, and dot immunobinding assay (DIBA) using the purified N proteins and antisera. (A) SDS-PAGE/silver staining and (B) Western blot of N proteins. M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). (C) DIBA for the evaluation of the polyclonal antisera produced against N1 (WCLaV-1) and N2 (WCLaV-2) antigens in different concentrations (1 µg; 0.1 µg; 0.01 µg; 0.001 µg / dot).

3.2 Evaluation of polyclonal antibodies using DIBA, antigen-coating ELISA, and Western blot

To evaluate the practical applicability of the antibodies in diagnosis, a series of procedures were performed using six field samples of watermelon. These tests included DIBA, antigen-coating ELISA and Western blot, with the aim of detecting WCLaV-1 and -2. RT-PCR was also performed for comparison (Fig. 3). Due to the cross-reaction with the N1 protein, the anti-N2 antibody was treated via cross-adsorption with N1 proteins

before use. RT-PCR (Fig. 3A) detected WCLaV-1 in samples 1, 2, 3 and 6, and WCLaV-2 in sample 6. These results are consistent with the findings observed in Western blot assays, which probed distinct bands of approximately 40 kDa for N1 and N2 proteins (Fig. 3B). With the anti-N1 antibody, WCLaV-1 was detected in samples 1, 2, 3, and 6, and with the anti-N2 antibody, sample 6 tested positive, showing double infection in sample 6. The specificity of the Western blot using both antibodies matched that observed by RT-PCR. The DIBA assay did not show clear results for any of the sample dilutions, particularly when the anti-N2 antibody was used (Fig. 3C). The antigen-coating ELISA (Fig. 3D) exhibited more pronounced reactions in samples 1, 2, 3 and 6 for anti-N1 and sample 6 for anti-N2 antibodies at all dilutions tested (1:20, 1:40 and 1:80). These findings were consistent with the results obtained from RT-PCR and Western blot analyses. We concluded that the antibody raised with the recombinant N1 protein has enough specificity and reactivity to be used in routine virus detection in antigen-coating ELISA format, and anti-N2 antibody is also useful after cross-absorption in antigen-coating ELISA format.

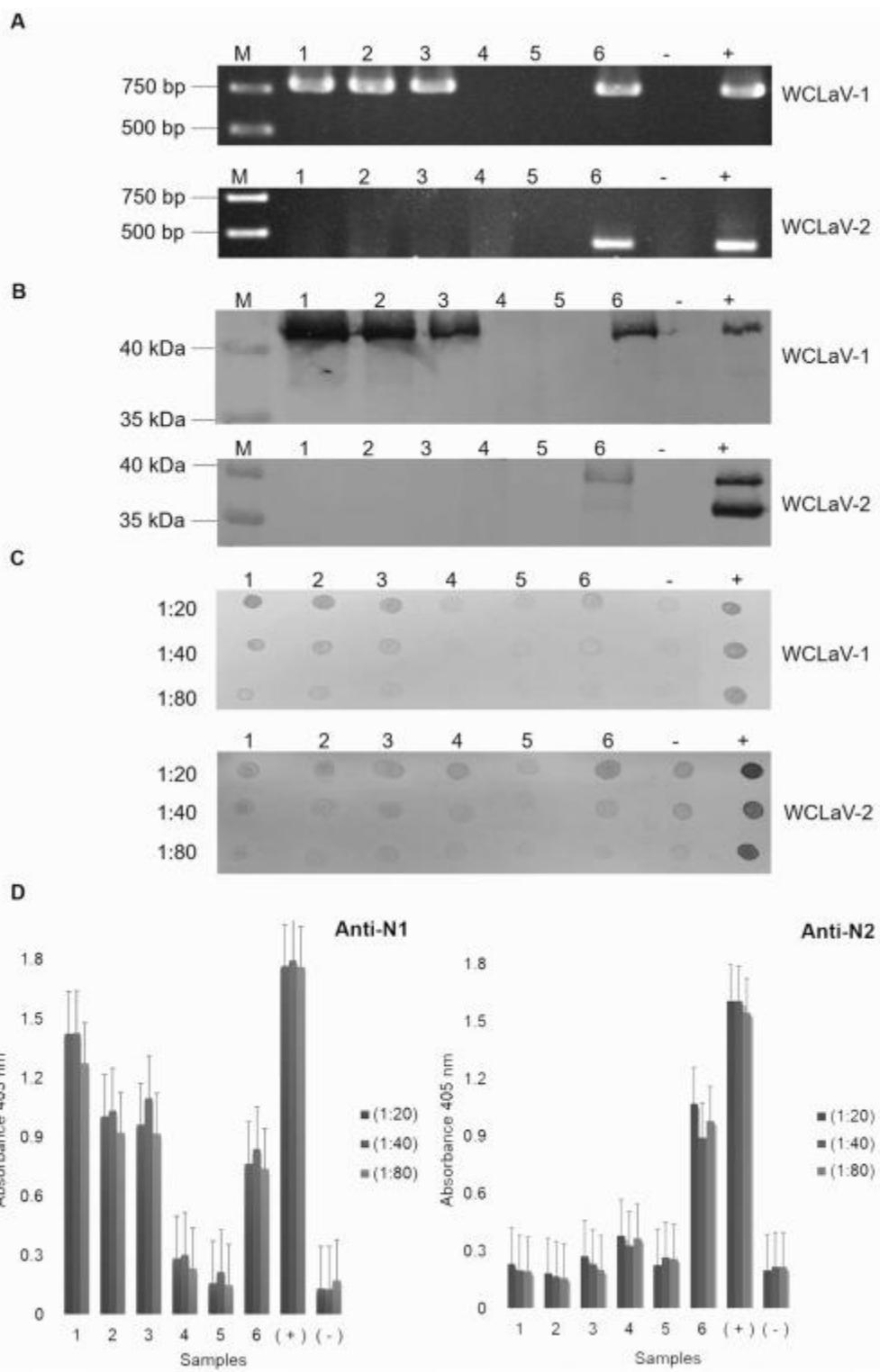


Fig. 3. Detection of WCLaV-1 and -2 using four different methods. (A) RT-PCR assay detecting viral *N* genes (the expected size of 786 bps for *N1* and 449 bps for *N2* genes). (B) Western blot using anti-N1 and anti-N2 antibodies (the expected size of 40 kDa for both proteins). (C) DIBA with anti-N1 and anti-N2 antibodies using a series of sample dilutions (1:20, 1:40, 1:80). (D) Antigen-coating ELISA using a series of sample dilutions (1:20, 1:40, 1:80). All tests were performed using leaf samples (samples 1 to 6) from watermelon field. (-) uninfected watermelon plants and (+) positive control.

3.3 Virus detection by antigen-coating ELISA, TBIA and immunolabeling using watermelon seedlings and seeds

We suspected the seed transmission of WCLaVs due to the positive reactions in uninoculated seedlings prepared from commercially available seeds of cv. ‘Crimson Sweet’. Furthermore, we found that hybrid seeds of cv. ‘Talisman’ were not contaminated with WCLaVs. To investigate virus seed contamination and transmission, we performed an antigen-coating ELISA using 259 seedlings of cv. ‘Crimson Sweet’, from commercial seeds. Considering, the minimum threshold for positive ELISA values was the average of the readings of three uninfected watermelon plants plus three times the standard deviation, 93.1% tested positive for WCLaV-1, and 17.8% tested positive for WCLaV-2. We also conducted antigen-coating ELISA on two other cultivars: cv. ‘Sugar baby’, which showed 50.0% positivity for WCLaV-1 and 25.0% for WCLaV-2; and cv. ‘Fairfax’, which exhibited 92.5% positivity for WCLaV-1 and 90.0% for WCLaV-2, with 40 seedlings tested for each cultivar.

To determine which part of the seed was infected, TBIA was performed on the cotyledon and seedlings of two-day-old wet seeds using only with anti-N1 antibody. TBIA showed that all parts of the seeds were infected with WCLaV-1 (Fig. 4A). The samples were then subjected to confocal microscopy. Micrographs show the presence of N proteins of WCLaV-1 in both parts of the cotyledons and radicles (Fig. 4B). Furthermore, we observed the colocalization of the N proteins and nuclei in the radicle (Fig. 4B). This colocalization of N protein/nuclei was not observed in other part of the plants. The immunolabeling assay was performed using leaf tissue from the later stages of seedlings. The presence of N proteins was observed in the cytoplasm of the leaf cells, but not in nucleus (Fig. 4C). Uninfected tissues of cv ‘Talisman’ used as negative control was not labeled in this experiment (Fig. 4B, C).

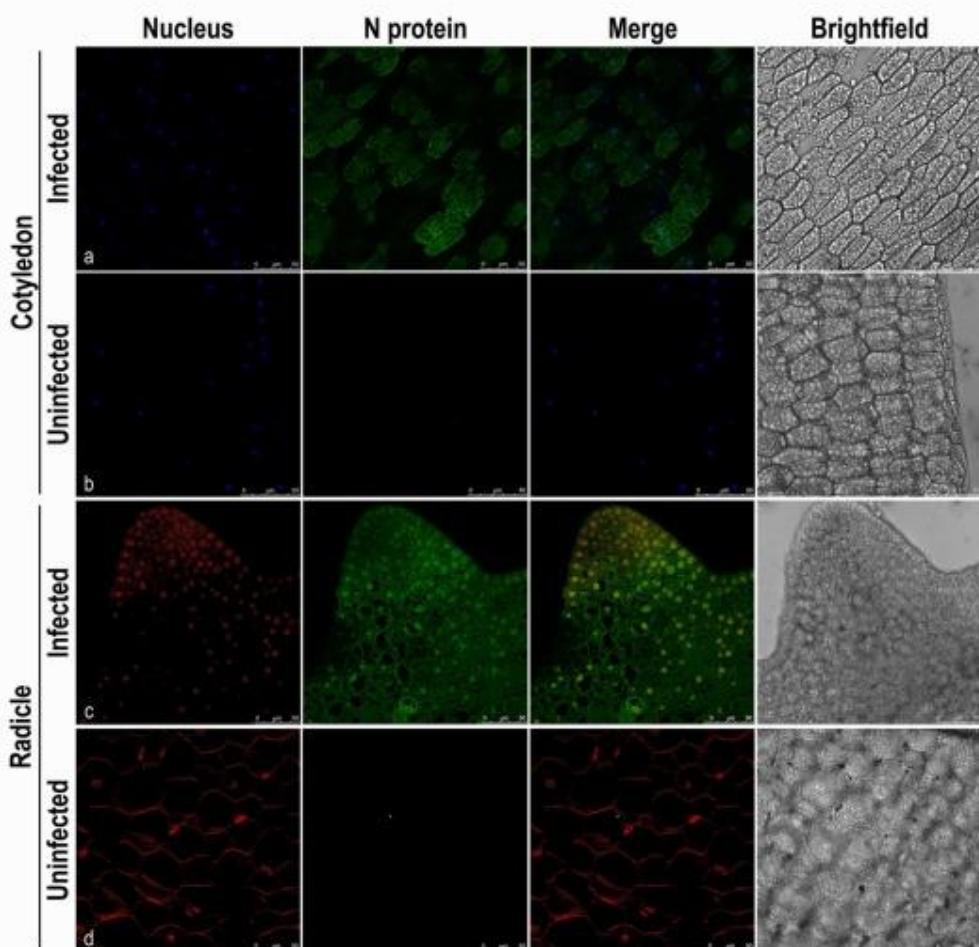
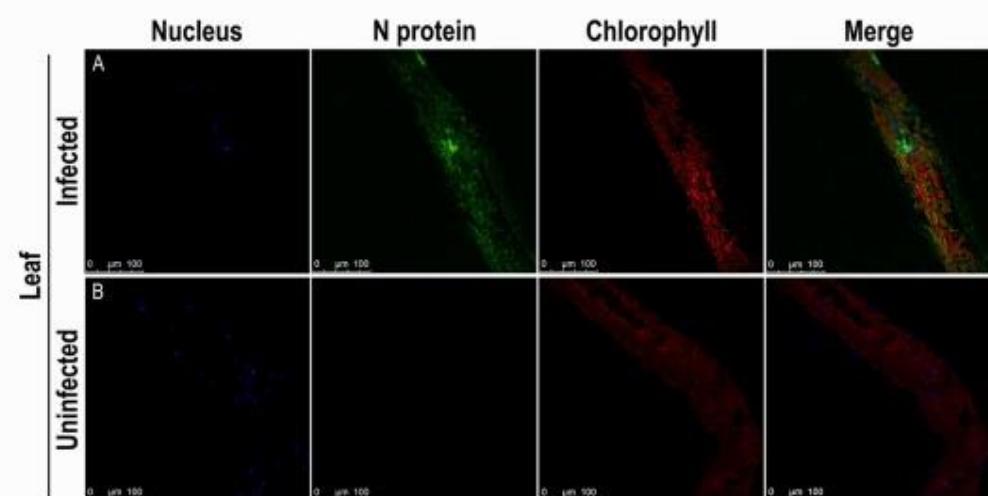
A**B****C**

Fig. 4. Tissue blot immunobinding assay (TBIA) and confocal microscopy of infected and uninfected seeds using anti-N1 antibody. (A) TBIA of infected and uninfected seeds using anti-N1 antibody (upper panel shows the position of the seed blotted onto the membrane and lower panel shows the results of TBIA). (B) Confocal micrographs of watermelon seed sections (a-d). Scale bars: 50 µm. Infected tissue of radicle and cotyledon (a, c) and uninfected tissue of radicle and cotyledon (b, d). Red pseudocolor was used for nuclei stained with DAPI to show distinct colocalization (red combined with green to produce yellow). The N protein of WCLaV-1 was immunolabeled with Alexa Fluor 488 (green). (C) Infected watermelon leaf (a) and uninfected watermelon leaf (b). WCLaV-1 was immunolabeled with Alexa Fluor 488 (green) and nuclei were stained with DAPI (blue). Chlorophyll is shown by autofluorescence (red). Scale bars: 100 µm.

WCLaV-1 infection through seeds was assessed using the TIBA procedure with anti-N1 antibodies on 9- and 31-day-old watermelon plants. The 9-day-old plant of cv. ‘Crimson Sweet’ exhibited generalized infection in the cotyledon, stem, and radicle, while no infection was observed in the plants of cv. ‘Talisman’ (Supplementary Fig. 1 A, B). Similarly, generalized infection was observed in 31-day-old plants of cv. ‘Crimson Sweet’, but not in the plants of cv. ‘Talisman’ (Supplementary Fig. 1 C). These results indicate that seed-transmitted WCLaV-1 particles were distributed throughout the plants during the early stages of plant development.

4. Discussion

The baculovirus-based system for gene expression is a good tool to obtain recombinant proteins for antibody production. Yeast-based gene expression systems are good eucaryotic cell systems for producing antigens. However, for many plant virologists, the most accessible eucaryotic system for gene expression might be a plant viral vector system, which provides suitable cell systems for plant viral protein folding, despite being relatively unexplored.

In this study, the antibody raised with the N1 and N2 recombinant proteins exhibited very high reactivity to the samples in antigen-coating ELISA and Western blot assays. Although a lower specificity was observed in anti-N2 antibody, both antibodies showed enough specificities to be used for routine serological diagnostics. We hypothesize that the reduced specificity of the anti-N2 antibody may arise from protein degradation and

contamination of plant proteins in the N2 antigen preparation. These findings show that the gene-expression system of PepRSV is a valuable tool for producing high-quality plant viral antigens.

Some viral genera, such as *Potyvirus*, *Potexvirus*, *Nepovirus*, *Tobamovirus* (Davino et al., 2020) and *Orthotospovirus* (Groves et al., 2016), are known for their recurring transmission through seeds. In this study, we demonstrated high seed-transmission rates of WCLaV-1 (50 to 93%) and WCLaV-2 (18 to 90%). These viruses can maintain infectivity inside the seed for a long time, as we recovered WCLaVs from seedlings originating from the oldest seed batch, which was eight years old (data not shown). WCLaV-1 and -2 are emerging viruses, and their occurrences were first reported in 2017 in China. They were subsequently found in several countries in a short period. The genomic sequences among the isolates from several countries are highly conserved, with the nucleotide identities above 99% in the RdRp region of WCLaV-1 isolates from China, the USA, Brazil, and Australia. These findings suggest that the rapid worldwide dissemination of the virus is primarily attributed to its transmission via seeds.

TBIA and confocal microscopy results suggest that WCLaV-1 was located inside the seed, both in the radicle and cotyledon. Evidence that WCLaV-1 is present inside the seed implies that the treatments for sterilization and disinfection of watermelon seeds are ineffective. The TBIA of seedlings further suggested that WCLaV-1 is present throughout the plant.

In this study, the presence of the N protein of WCLaV-1 in nucleus was demonstrated, but restricted to the radicles, not in other parts of the plants. We analyzed the amino acid sequence using multiple nuclear-localization signal (NLS) predictors (<https://nucpred.bioinfo.se/cgibin/single.cgi>; www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/INSP; <https://localizer.csiro.au>; www.compbio.dundee.ac.uk/www-nod/index.jsp).

Nevertheless, none of the nucleolar localization sequences were identified in the N1 protein by the NLS predictors. It is well known that the N protein of nucleorhabdoviruses is typically located in nucleus (Tsai et al., 2005). It has also been observed that the N protein of viruses in *Bunyavirales*, such as rice stripe virus (*Tenuivirus*), was also found in the nucleus (Lian et al., 2014). Similarly, the N protein of WCLaV-1 was observed in the nucleus, but only in the radicle in this study. This observation implies that the nuclear transport of the N protein of WCLaV-1 is not an intrinsic characteristic of the protein; instead, it is likely facilitated by an unidentified partner protein for nuclear localization. The viral proteins in nucleus may associate the modulation of gene expression of the host cells. The mechanism of the nuclear localization and the interactions with host cells should be investigated further in future studies.

The aim of this study was to produce serological tools for WCLaV-1 and -2 employing a newly developed plant virus vector, PepRSV. Additionally, we sought to validate seed transmission using the specific antibodies. Moreover, the distribution of the virus in plants and its subcellular localization were investigated using these antibodies. These findings may contribute for basic research, breeding programs, and efforts to manage the dissemination of the viruses through seeds to different countries.

5. References

- Adeleke, I.A., Kavalappara, S.R., Torrance, T., Bennett, J.E., McGregor, C., Srinivasan, R., Bag, S., 2022. First report of watermelon crinkle leaf-associated virus 1 naturally infecting watermelon (*Citrullus lanatus*) in Georgia, USA. *Plant Dis.* 106, 2273. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-21-2521-PDN>.
- Agrios, G.N., 2005. *Plant Pathology*, Fifth edition., Elsevier Academic Press, Amsterdam, the Netherlands.
- Ali, A., Mohammad, O., Khattab, A., 2012. Distribution of viruses infecting cucurbit crops and isolation of potential new virus-like sequences from weeds in Oklahoma. *Plant Dis.* 96, 243–248. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0419>.
- Andrade, I.A., Franca, L.V., Kauffmann, C.M., Maeda, M.H.K., Koyama, L.H.H., Hamann, P.R.V., Lopes-Luz, L., Fogaça, M.B.T., de Camargo, B.R., Ribeiro, B.M., Bührer-Sekula, S., Nagata, T., 2023. Practical use of tobaviruses-based vector to produce SARS-CoV-2 antigens in plants. *J. Virol. Methods* 315, 114710. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2023.114710>.
- Blawid, R., Nagata, T., 2015. Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson assembly. *J. Virol. Methods* 222, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.05.003>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Clark, M.F., Lister, R.M., Bar-Joseph, M., 1986. ELISA techniques. *Methods Enzymol.* 118, 742–766. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)18114-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)18114-6).
- Davino, S., Caruso, A.G., Bertacca, S., Barone, S., Panno, S., 2020. Tomato brown rugose fruit virus: seed transmission rate and efficacy of different seed disinfection treatments. *Plants* 9, 1615. <https://doi.org/10.3390/plants9111615>.
- Groves, C., German, T., Dasgupta, R., Mueller, D., Smith, D.L., 2016. Seed transmission of soybean vein necrosis virus: the first Tospovirus implicated in seed transmission. *PLoS One* 11, e0147342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147342>.
- Hendricks, K.E., Hernandez, R.N., Roberts, P.D., Isakeit, T., Alabi, O.J., 2022. First report of watermelon crinkle leaf-associated virus 1 (WCLaV-1) and WCLaV-2 in watermelon (*Citrullus lanatus*) plants coinfecting with cucurbit chlorotic yellows virus in Florida. *Plant Dis.* 106, 339. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1141-PDN>.
- Hernandez, R.N., Isakeit, T., Al Rwahnih, M., Villegas, C., Alabi, O.J., 2021. First report of watermelon crinkle leaf-associated virus 1 (WCLaV-1) and WCLaV-2 infecting watermelon (*Citrullus lanatus*) in the United States. *Plant Dis.* 105, 2025. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-21-0249-PDN>.
- Hull, R., 2014. *Plant virology*. Elsevier Academic Press, London, UK.
- Lian, S., Cho, W.K., Jo, Y., Kim, S.M., Kim, K.H., 2014. Interaction study of rice stripe virus proteins reveals a region of the nucleocapsid protein (NP) required for NP self- interaction and nuclear localization. *Virus Res* 183, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.01.011>.
- Maeda, M.H.K., Koyama, L.H.H., Campos, R.N.S., Kauffmann, C.M., Souza, J.O., Gilbertson, R., Inoue-Nagata, A.K., Freitas, D.M.S., Nogueira, D.R.S., Melo, F.L., Nagata, T., 2022. First report of watermelon crinkle leaf-associated virus 1 and 2 infecting watermelon (*Citrullus lanatus*) plants in Brazil. *Plant Dis.* 106, 773. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1325-PDN>.
- Mulholland, S., Wildman, O., Kinoti, W.M., Constable, F., Daly, A., Tesoriero, L., Chapman, T.A., 2023. First report of watermelon crinkle leaf associated virus-1

(WCLaV-1) in watermelon (*Citrullus lanatus*) in Australia. *J. Plant Pathol.* 105, 295–297. <https://doi.org/10.1007/s42161-022-01250-8>.

Souiri, A., Zemzami, M., Amzazi, S., Ennaji, M.M., 2014. Polyclonal and monoclonal antibody-based methods for detection of plant viruses. *Eur. J. Sci. Res.* 123, 281–295.

Tavares-Esashika, M.L., Campos, R.N.S., Blawid, R., da Luz, L.L., Inoue-Nagata, A.K., Nagata, T., 2020. Characterization of an infectious clone of pepper ringspot virus and its use as a viral vector. *Arch. Virol.* 165, 367–375. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04505-5>.

Tavares-Esashika, M.L., Campos, R.N.S., Maeda, M.H.K., Koyama, L.H.H., Hamann, P.R.V., Noronha, E.F., Nagata, T., 2022. Development of a heterologous gene expression vector in plants based on an infectious clone of a tobaviruses, pepper ringspot virus. *Ann. Appl. Biol.* 181, 107–116. <https://doi.org/10.1111/aab.12758>.

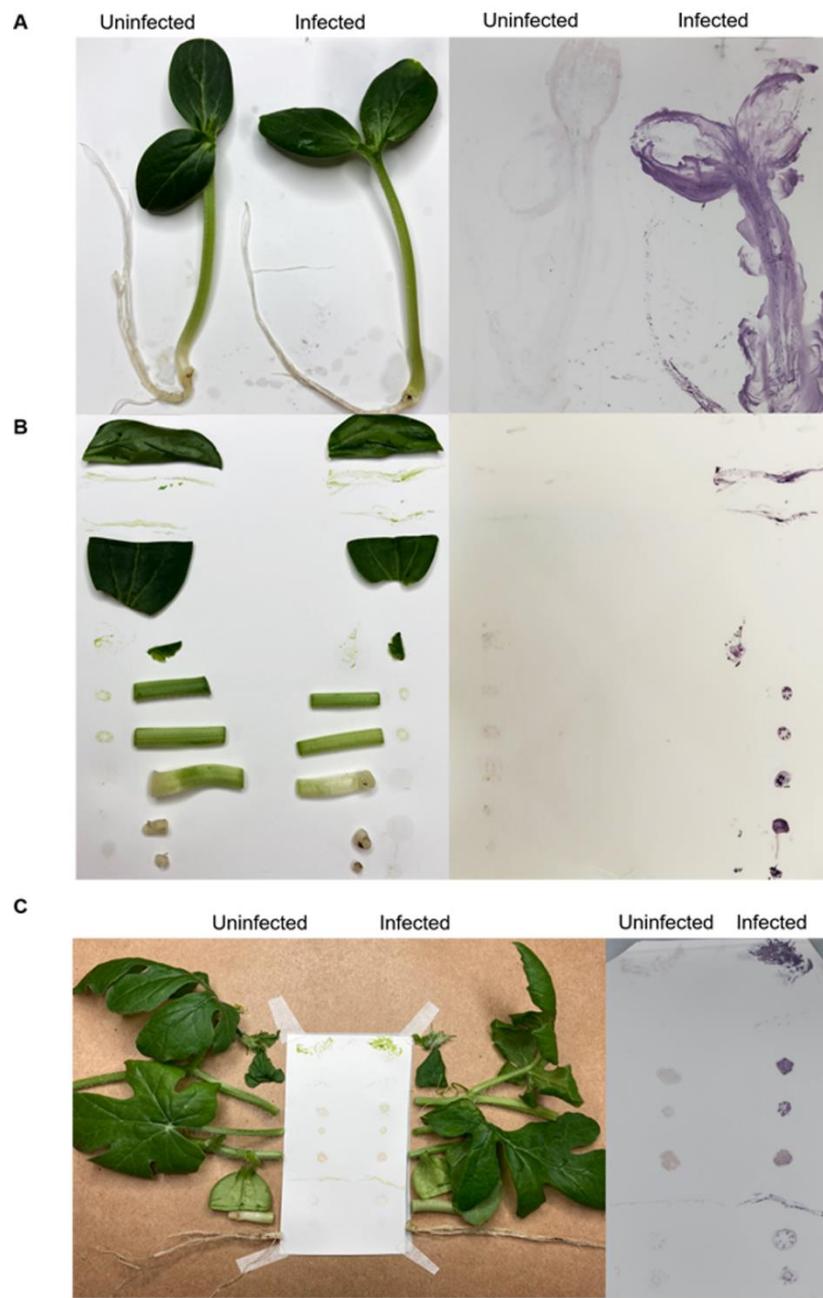
Tsai, C.W., Redinbaugh, M.G., Willie, K.J., Reed, S., Goodin, M., Hogenhout, S.A., 2005. Complete genome sequence and in planta subcellular localization of maize fine streak virus proteins. *J. Virol.* 79, 5304–5314. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.9.5304-5314.2005>.

Xin, M., Cao, M., Liu, W., Ren, Y., Lu, C., Wang, X., 2017. The genomic and biological characterization of *Citrullus lanatus* cryptic virus infecting watermelon in China. *Virus Res.* 232, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.02.009>.

Zhang, S., Tian, X., Navarro, B., Di Serio, F., Cao, M., 2021. Watermelon crinkle leaf-associated virus 1 and watermelon crinkle leaf-associated virus 2 have a bipartite genome with molecular signatures typical of the members of the genus Coguvirus (family Phenuiviridae). *Arch. Virol.* 166, 2829–2834. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05181-0>.

Supplementary table 1. List of primers designed for cloning of the *N* gene and detection of watermelon crinkle leaf-associated virus 1 and 2

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Reference
WCLaV-1-N-Rev	ATGATGGTGGTGATGATGAAGCTGACTGAT GTCAGACA	
WCLaV-1 N-For	CTGCAATCACCTGCGAAAATGGACCACAC TAACGCAG	
WCLaV-2-N-Rev	ATGATGGTGGTGATGATGATTGAAGCTCAT AACAGCTGA	This study
WCLaV-2 N-For	CTGCAATCACCTGCGAAAATGTCTTCTTCT TCAAGAACAAAC	
WCLaV-1vNP	CGAATAGACTCTGGAGGGTAGA	
WCLaV-1cMP	GAAAGCAAGAAAGCTGGCTAAA	Hernandez <i>et al.</i> , 2021
WCLaV-2vNP	ATTCCCAGTGAGAGCAACAA	
WCLaV-2cMP	GAGGTGGAGGTAGGAAAGAAAG	
RNA2_Backbone_For	TCTGCCCAAGTGGAGCT	This study
RNA2-noCP_Rev	TTTGCGCAGGTGATTGCAG	



Supplementary figure 1. TBIA throughout the watermelon plant. (A) Whole seedling blot analysis (9 days old). (B) Section of the whole-seedling (9 days old) blot. (C) Section of the whole-plant (31 days old) blot.

CAPÍTULO 2- Estudo da resposta imune de *Nicotiana benthamiana* contra um mutante do vírus pepper ringspot virus

Resumo

O entendimento dos mecanismos de defesa das plantas é fundamental para o enfrentamento de doenças virais que impactam culturas agrícolas. Este estudo investigou a resposta imune de *Nicotiana benthamiana* à infecção pelo pepper ringspot virus (PepRSV), com ênfase nas diferenças induzidas pelos clones 2 e 4 do vírus. Para isso, foram realizados ensaios histoquímicos para a detecção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), coloração com DAB para observação da deposição de calose, silenciamento gênico do gene *SGT1* e quantificação da expressão relativa dos genes WRKY1 e ACRE132, a fim de estudar os mecanismos de defesa envolvidos. Os resultados mostraram que a produção de H_2O_2 , um tipo de espécie reativa de oxigênio, foi intensificada nas plantas infectadas com o clone 4, sendo detectada em todos os tempos avaliados (24, 48 e 72 horas pós infiltração - h.p.i.), o que resultou em uma resposta sintomática caracterizada por lesões de hipersensibilidade (HR-like) visíveis após 72 h.p.i.. Essa reação foi acompanhada por um aumento na deposição de calose, visível em 24 h.p.i., um indicativo de uma defesa precoce. Em contraste, nas plantas infectadas com o clone 2, não se observou a produção de H_2O_2 , embora a deposição de calose tenha sido detectada em todos os tempos avaliados (24 e 48 h.p.i.), sugerindo uma infecção menos agressiva ou um possível escape da resposta imune. A análise da expressão gênica revelou que, nas plantas infectadas com o clone 4, os genes WRKY1 e ACRE132, envolvidos na morte celular programada e na imunidade mediada por padrões, respectivamente, apresentaram maior expressão, indicando que o vírus pode ativar vias de defesa que envolvem esses genes. Já nas plantas com o clone 2, não se observou o aumento da expressão desses genes. Além disso, o papel da proteína SGT1, essencial para a ativação

de receptores NLRs e resposta ETI, foi investigado por silenciamento do gene *SGT1*. Embora a expressão reduzida de SGT1 tenha sido observada, a resposta “HR-like” permaneceu. A pesquisa também enfrentou desafios na normalização dos dados de expressão gênica devido à variação na estabilidade dos genes de referência, o que resultou em respostas inconclusivas sobre o comportamento dos genes quantificados. Para avançar nas análises, será realizado um novo ciclo de seleção de genes de referência. Este estudo não apenas amplia o entendimento sobre a complexidade das respostas imunes das plantas a infecções virais, mas também fornece *insights* valiosos sobre a ativação das vias de defesa e o papel de proteínas-chave, como a SGT1. Ao revelar a dinâmica de respostas como a produção de H₂O₂ e a deposição de calose, além de destacar as nuances da expressão gênica durante a interação com diferentes clones virais, esta pesquisa estabelece as bases para futuras pesquisas focadas na interação PepRSV/*N. benthamiana*.

Palavras-chave: Resposta imune, peróxido de hidrogênio, calose, *SGT1*, Expressão gênica.

1. Introdução

O *Tobravirus capsici* (pepper ringspot virus, PepRSV) é um tobrevírus de genoma bi-segmentado, contendo RNA1 e RNA2, amplamente utilizado em pesquisas para a expressão de genes heterólogos, como a proteína fluorescente verde, a xilanase (Tavares-Esashika et al. 2022), os fragmentos parciais dos genes spike e nucleocapsídeo do vírus *Betacoronavirus pandemicum* (severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2) (Andrade et al. 2023; Fogaça et al. 2024) e o gene do nucleocapsídeo dos vírus *Coguvirus citrulli* e *C. henanense* (Kauffmann et al., 2024).

No desenvolvimento dos clones infecciosos de PepRSV, dois clones distintos de RNA2 foram produzidos a partir do mesmo isolado Ag1 de tomateiro (o RNA1 do vírus foi mantido como do isolado CAM, Tavares-Esashika et al., 2022). O clone 2 causou infecção sistêmica típica, enquanto o clone 4, com uma mutação no gene da capa proteica (CP), resultou em lesões localizadas e uma resposta semelhante à hipersensibilidade (*HR-like*), restringindo o movimento viral. A mutação no clone 4, uma inserção de citidina na posição 575 do gene da CP (total de 673 nt), causou uma mudança de quadro de leitura (*frameshift*) com geração de 29 resíduos novos de aminoácidos (aa) de um tamanho total de 208 aa, comparando com o clone 2 de 31 aa no terminal C do total de 210 aa (Figura 3). Essa alteração no gene da CP levou à incapacidade do clone 4 de estabelecer infecção sistêmica e à produção de partículas virais, resultando em morte celular localizada no tecido foliar (Tavares-Esashika, 2021).

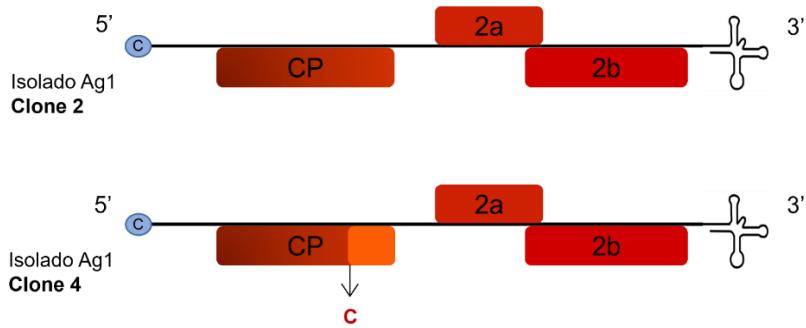


Figura 3. Esquema representativo da organização genômica do RNA2 dos clones 2 e 4 do pepper ringspot vírus (PepRSV). Comparação entre o clone 2 do isolado Ag1 de PepRSV, associado à indução de sintomas sistêmicos, e o clone 4, uma variante mutante do mesmo isolado contendo a inserção de uma citidina no gene da proteína do capsídeo (CP), resultando na manifestação de lesões locais.

As lesões do tipo "HR-like" observadas no clone 4 de PepRSV estão potencialmente associadas à ativação de mecanismos imunes das plantas, envolvendo a imunidade desencadeada por padrões (PTI) e/ou a imunidade mediada por efetores (ETI) (Kourelis et al. 2018; Piau & Schmitt-Keichinger, 2023). PTI é uma resposta basal desencadeada por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), mediada por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes na superfície celular, enquanto ETI é uma resposta mais específica e amplificada, mediada por receptores NLRs (receptores de domínio de ligação a nucleotídeos e repetições ricas em leucina) intracelulares (Bigeard et al. 2015). As NLRs representam o maior grupo de genes de resistência (R) em plantas, assim as plantas ativam PTI e ETI usando PRRs e NLRs para enfrentar patógenos (Kourelis et al. 2018; Zhou & Zhang, 2020). A interação entre PTI e ETI não é independente, mas sim interconectada, como mostrado em estudos recentes (Yuan et al., 2021; Ngou et al., 2022).

Além disso, no contexto da infecção de *Nicotiana benthamiana* pelo PepRSV, a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e a deposição de calose têm se mostrado importantes para a ativação dessas respostas imunes (Hernández et al. 2016; Das et al. 2014; Kumar et al. 2024). As ROS, especialmente o H_2O_2 , desempenham um papel crucial na inibição localizada de

patógenos e no estresse oxidativo. Em estudos com o *Tobamovirus tabaci* (tobacco rattle virus), a aplicação de baixas concentrações de H₂O₂ em folhas de tabaco resultou na supressão da necrose do tipo “HR-like” associada ao vírus (Hafez et al. 2012). Além disso, o influxo de Ca²⁺ regula a sinalização de defesa, incluindo a ativação de ROS e processos que levam à deposição de calose, um polissacarídeo classificado como β-1,3-glucana, que intensifica seu acúmulo quando as plantas são expostas a condições ambientais adversas ou à invasão de patógenos, o acúmulo de calose é intensificado como parte de uma resposta defensiva, auxiliando no reforço das paredes celulares e na restrição da propagação de patógenos (Luna et al. 2011). A deposição de calose contribui para o reforço das paredes celulares, restringindo a propagação de patógenos e promovendo resistência a estresses bióticos e abióticos (Luna et al. 2011; Chen et al. 2024). Adicionalmente, a proteína SGT1 (supressor do alelo G2 de skp1) tem papel fundamental na ativação de NLRs e na indução de HR para estabelecimento de ETI, sendo essencial para a estabilidade e ativação dessas proteínas receptoras que conferem resistência (Wu et al. 2017). Com base na premissa de que a reação do tipo “HR-like” provocada pelo clone 4 seja mediada por PTI, o nocaute do gene SGT1 pode ser realizado, como demonstrado por Yu e colaboradores (2021) em *Nicotiana benthamiana* e *Arabidopsis thaliana*, evidenciando que SGT1 não é necessária para as respostas desencadeadas por PTI.

A resposta HR-like observada com o clone 4 pode também ser observada pela expressão de genes de defesa. O gene WRKY1, um fator de transcrição envolvido em respostas imunes, pode regular a resposta do tipo “HR-like” da planta à infecção viral, como sugerido por estudos com outros vírus de plantas (Qin et al., 2023). O gene ACRE132 (*Avr9/Cf-9 rapidly elicited gene 132*), por sua vez, está diretamente envolvido na resposta hipersensível e é rapidamente induzido em resposta à interação entre proteínas

efetoras de patógenos e genes de resistência (Heese et al. 2007; Nicaise & Candresse, 2016). A expressão de ACRE132 tem sido associada ao controle da resposta hipersensível em *Nicotiana tabacum* (Rowland et al., 2005) e foi identificado como um marcador importante na resposta PTI em *N. benthamiana* (Heese et al., 2007).

O mecanismo exato pelo qual essas respostas imunes contribuem para a formação das lesões do tipo “HR-like” ainda não está completamente elucidado. A investigação da interação entre a PTI e a ETI, mediada por ROS e deposição de calose, pode ser um passo inicial para a indução da morte celular e a resistência ao avanço do vírus. Para entender melhor como esses mecanismos funcionam no contexto da infecção por PepRSV, proposto neste estudo a investigação da formação de ROS, da deposição de calose, da expressão dos genes WRKY1 e ACRE132, e do papel da SGT1 na resposta hipersensível induzida pelo clone 4 do PepRSV em plantas de *N. benthamiana*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), a deposição de calose, a expressão de genes associados à imunidade inata mediada por PTI e ETI e o papel da proteína SGT1 na resposta hipersensível induzida pelo clone 4 do PepRSV em plantas de *N. benthamiana*.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Avaliar a presença e a localização do peróxido de hidrogênio, ROS, no tecido foliar de *N. benthamiana* infectado com o clone 4 do PepRSV, utilizando o clone 2 como referência, e correlacionar a formação das respostas “HR-like”.

- 2- Visualizar a presença de deposição de calose no tecido foliar de *N. benthamiana* após agroinfiltração com o clone 4 do PepRSV, com o clone 2 como referência, utilizando microscópio de fluorescência.
- 3- Avaliar o papel da proteína SGT1 na produção de respostas do tipo hipersensibilidade durante a infecção pelo clone 4 de PepRSV em *N. benthamiana*, por meio do nocaute do gene SGT1, observando as diferenças em relação ao clone 2.
- 4- Analisar a expressão dos genes relacionados à imunidade mediada por PTI e ETI, como WRKY1 e ACRE132, em *N. benthamiana* com respostas do tipo hipersensibilidade induzida pelo clone 4 de PepRSV, utilizando RT-qPCR.

3. Material e métodos

3.1 Material vegetal e condições de crescimento

As plantas de *N. benthamiana* foram cultivadas em vasos com solo pré-misturado em câmara climática a 25°C, com 80% de umidade e sob fotoperíodo de 16h/8 h.

3.2 Agroinfiltração de clone infeccioso de PepRSV em plantas de *N. benthamiana*

Este estudo foi realizado utilizando o clone infeccioso de PepRSV isolado Ag1, denominado de clone 2 e seu mutante, denominado clone 4, ambos inseridos no vetor binário pJL89 conforme descrito por Tavares-Esashika et al. (2021). As células de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101:pMP90) contendo as construções dos clones RNA 1 (isolado CAM) e RNA 2 (do clone 2 e do clone 4) foram incubadas a 28° C em meio líquido sob agitação orbital de 180 rpm ± 20 horas. Após o período de incubação, 2 mL da cultura foram adicionados em 6 mL de tampão de indução completo, conforme descrito por Bucher et al. (2003), para induzir a expressão dos genes de virulência da bactéria. A concentração da cultura foi ajustada para uma OD₆₀₀ de 1,0. Em seguida, a

cultura foi centrifugada a $5000 \times g$ por 5 minutos e o *pellet* foi ressuspendido em solução de agroinfiltração, composta por meio Murashige-Skoog (Sigma-Aldrich), contendo 1 M MES (pH 5,6) e 50 μM de acetoseringona). A proporção de 1:1 entre RNA 1 (isolado CAM) e RNA 2 (clone 2 ou clone 4) foi utilizada para agroinfiltração de 20 plantas de *N. benthamiana* com seis semanas de idade. As folhas foram infiltradas, exceto folhas muito jovens, com auxílio de uma seringa sem agulha nas quatro extremidades da folha (Figura 4). É importante destacar que, em todos os experimentos de agroinfiltração descritos nesse estudo, o RNA1 (isolado CAM) foi sempre agroinfiltrado juntamente com o RNA2 do clone 2 ou do clone 4 de PepRSV na mesma planta, para garantir o estabelecimento do processo de infecção. Assim, para simplificação, o conjunto RNA1 + RNA2 do clone 2 será referido como “clone 2” e o conjunto RNA1 + RNA2 do clone 4 será denominado “clone 4” ao longo deste trabalho.

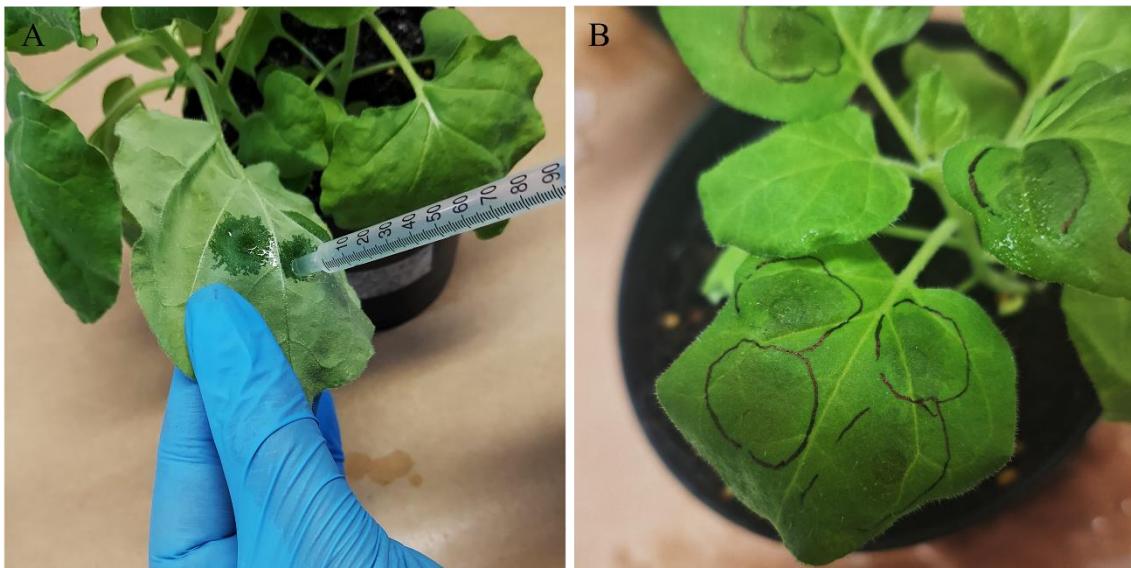


Figura 4. Plantas de *Nicotiana benthamiana* submetidas à agroinfiltração foliar. (A) Face abaxial da folha durante o processo de agroinfiltração. (B) Delimitação das quatro extremidades da folha após a agroinfiltração.

3.3 Ensaio histoquímico de H₂O₂

O acúmulo total de H₂O₂ foi avaliado por meio da coloração com DAB (cloridrato de 3,3'-diaminobenzidina) (Daudi et al. 2012; Qiu et al. 2021) com algumas adaptações.

Após a agroinfiltração dos clones 2 e 4, além dos controles (plasmídeo vazio pJL89 e solução de agroinfiltração), em plantas de *N. benthamiana*, as folhas foram destacadas em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas após a infiltração, hpi) (Figura 5A) e incubadas em uma solução de DAB (1 mg/mL) contendo Tween-20 (0,05% v/v) e tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0) (Figura 5B) em condições de ausência de luz e sob agitação. O experimento foi realizado com pelo menos três ensaios independentes. A reação de coloração foi interrompida quatro horas após a infiltração com DAB e as folhas foram fixadas em uma solução de etanol:glicerol:ácido acético na proporção de 3:1:1 (solução de branqueamento), sendo colocadas em banho-maria a 95 °C por 15 min (Figura 5C). Em seguida, as folhas foram incubadas novamente em solução de branqueamento até que a cor da clorofila não estivesse mais visível nas folhas (Figura 5D), e a visualização foi feita sob luz branca e fotografadas.

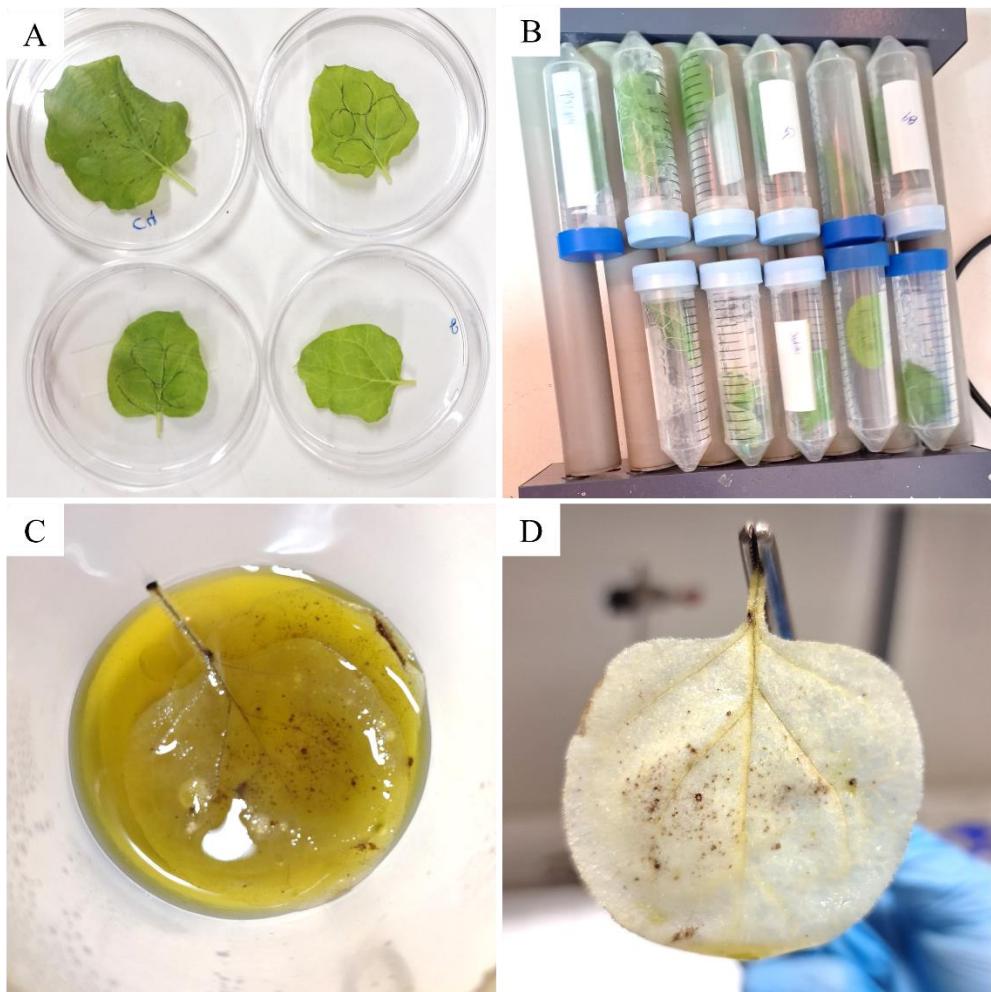


Figura 5. Etapas do ensaio histoquímico para a detecção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas com os clones 2 e 4 e controles. (A) Coleta de folhas inteiras de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. (B) Incubação das folhas em solução de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) sob agitação constante para a detecção de H_2O_2 . (C) Despigmentação das folhas por incubação em solução de branqueamento. (D) Folha após o processo de despigmentação, evidenciando a remoção da clorofila.

3.4 Ensaio de deposição de calose

A deposição de calose foi avaliada por meio de coloração com azul de anilina, seguindo o protocolo de Mason et al. (2020) com algumas adaptações. Após a agroinfiltração dos clones 2 e 4, além dos controles (plasmídeo vazio pJL89 e solução de agroinfiltração), em plantas de *N. benthamiana*, as folhas foram coletadas em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas após a infiltração, h.p.i). O tecido foliar foi inicialmente incubado em etanol a 95% em placas de Petri sob agitação à temperatura ambiente (TA) até a completa remoção da clorofila. Em seguida, as amostras foram incubadas em etanol a 50% por 1 hora, também sob agitação em TA. Após essa etapa, o

tecido foliar foi lavado e incubado com uma solução de fosfato de potássio (K_2HPO_4 , 67 mM, pH 12) por 1 hora sob agitação em TA. Posteriormente, o material foi transferido para placas de Petri contendo uma solução de azul de anilina a 0,01% (p/v) em K_2HPO_4 (67 mM, pH 12), incubando por 2 horas no escuro, agitação em TA. Após a incubação, as amostras foram lavadas novamente com K_2HPO_4 (67 mM, pH 12). As lâminas foram preparadas com fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific) para preservar a fluorescência, sendo então visualizadas em microscópio de fluorescência Zeiss AxioPhot (LSM-510) (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

3.5 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) e expressão transiente mediada por *A. tumefaciens* em *N. benthamiana*

Para realizar o ensaio de silenciamento do gene *SGT1* em *N. benthamiana*, foi utilizada a técnica de silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS). Inicialmente, o RNA total das plantas foi extraído utilizando o *Total RNA Purification Kit* (Cellco Biotec, São Carlos, Brasil), conforme as instruções do fabricante. A amplificação do gene *SGT1* foi realizada por reação de PCR com a enzima Q5® *High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs, Ipswich, EUA), de acordo com o protocolo recomendado. Os primers utilizados para a amplificação do gene *SGT1* foram: _SGT_VIGS_pgR107 For (AGGTCAAGCACCCAGCTAGCGCCATGACTCCTAAGAACGCTG) e Nb_SGT_VIGS_pgR107_Rev (CTATCAAGCTTATCGCGCCAAACAAACCTAGGCTGGAAAGA), sendo que a sequência nucleotídica sublinhada corresponde à origem do vetor pgR107. Simultaneamente, foi amplificado o vetor de expressão potato virus X (PVX), pgR107 (Chapman et al. 1992), utilizando os primers pgR107_1235_Half_For (ATCTAGAGGGGTTCGGCATAGC) e pgR107_CloSite_Rev

(GCTAGCTGGTGCTGACCTCT); além de pGR107_CloSite_For (CGCCGATAAGCTTGATAGGGC) e pgR107_1256_Half_Rev (GCTATGCCGAACCCCTCTAGAT). Após a confirmação da amplificação, os produtos de PCR foram purificados usando o *Gel Band Purification Kit* (GE, Healthcare Life Sciences, Chicago, EUA). Os fragmentos purificados foram submetidos à montagem por *Gibson Assembly* (GA), utilizando o *Gibson Assembly Cloning Master Mix*, New England Biolabs). O produto resultante da reação de GA foi utilizado para transformação das células de *Escherichia. coli* (cepa DH10B) por eletroporação, conforme descrito por Blawid & Nagata (2015). Após o sequenciamento pelo método de Sanger e confirmação da clonagem, células de *A. tumefaciens* GV3103::pSOUP foram transformadas com os clones recombinantes. A infiltração do vetor silenciador VIGS contendo o gene *SGT1* foi realizada em plantas de *N. benthamiana*. Dez dias após a agroinfiltração (do VIGS contendo o gene *SGT1*), o clone CAM do RNA1 e clones 2 e 4 do RNA2 do PepRSV foram infiltrados nas folhas superiores novas, conforme descrito item 3.2). A expressão transiente foi avaliada usando qPCR, conforme os detalhes descritos abaixo, com primers específicos Nb_SGT_VIGS_pgR107_F e Nb_SGT_VIGS_pgR107_R para a detecção da expressão do gene alvo.

3.6 Preparação de RNA total e análise por RT-qPCR para seleção genes de referência e avaliação da expressão dos genes WRKY1, ACRE132 e SGT1

O RNA total foi extraído de folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com os clones 2 e 4 do PepRSV além dos controles (plasmídeo vazio pJL89 e solução de agroinfiltração), em dois tempos distintos: 24 e 48 horas após a infiltração (h.p.i). A extração do RNA total foi realizada utilizando o *Total RNA Purification Kit* (Cellco Biotec, São Carlos, Brasil). Após a extração, o RNA foi tratado com a enzima RQ1

RNase-Free DNase (Promega), conforme as orientações do fabricante, para garantir a remoção de DNA genômico. A quantificação do RNA extraído foi realizada por espectrofotometria utilizando o NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, EUA). A partir dessa quantificação, 1 µg de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA, usando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) e primers oligo(dT)+ primers específico de PepRSV, seguindo as orientações do fabricante. A reação de qPCR foi conduzida com o kit *SybrMaster + ROX* (Cellco Biotec), seguindo as condições recomendadas para amplificação. Para a análise da expressão gênica, foram avaliados sete genes de referência interna: ACT, AGO2, EF1A, GAPDH, L23, PP2A, Tsanp, UB (Tabela 1) conforme descrito por Liu et al. (2012) e Zhang et al. (2023a). Inicialmente, dois genes marcadores foram escolhidos para avaliar a expressão relacionada às vias de imunidade: *WRKY1*, associado à imunidade mediada por efetores (ETI) (Qin et al. 2023) e *ACRE132*, associado à imunidade desencadeada por padrões (PTI) (Nicaise & Candresse, 2016). Para as plantas nas quais foi realizado o silenciamento do gene *SGT1* por VIGS, a análise de expressão desse gene foi feita utilizando primers específicos com o objetivo de verificar a eficiência do silenciamento. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando o modelo ΔCq , com a normalização baseada nos múltiplos genes de referência, conforme descrito por Hellemans et al. (2007), que desenvolveu o software qBASE. O valor de ΔCq foi utilizado para calcular a variação relativa na expressão de *WRKY1*, *ACRE132* e *SGT1*, em relação ao controle.

Tabela 1: Informações dos 9 genes de referência potenciais para a interação PepRSV/*Nicotiana benthamiana* para avaliação por RT-qPCR e sequências de primers

Genes	Nome completo dos genes	Sequência (5'-3')	Referência
NbL23_For	Proteína ribossomal 60S	CTCACCAACCGAGTCTG	Liu et al. 2012
NbL23_Rev		ATCGTAGTCAGGAGTCAACC	
NbEF1 α _For	Fator de elongação 1 α	AGCTTTACCTCCCAAGTCATC	Zhang et al. 2023a
NbEF1 α _Rev		AGAACGCCTGTCAATCTTGG	
NbTspan_For	Tetraspanina-20	TGTCGCTGTTCTGCTTTC	Zhang et al. 2023a
NbTspan_Rev		CACGCCATTCTCTACACTTC	
NbF-BOX_For	Proteína F-box	ATCTTGCTCCTCCAAGATGG	Liu et al. 2012
NbF-BOX_Rev		TCCTTCCAACCAGAAATAGACG	
NbACT_For	Actina	AAAGACCAGCTCATCCGTGGAGAA	Zhang et al. 2023a
NbACT_Rev		TGTGGTTTCATGAATGCCAGCAGC	
NbUB_For	Enzima conjugadora de ubiquitina 3	CCGATTACAACATCCAGAAGG	Liu et al. 2012
NbUB_Rev		TAGGACACTCCTACGAAGC	

NbAGO2_For	Proteína Argonauta-2 putativa	CATTGAAACCTCCTTCTATCGAC	Zhang et al. 2023a
NbAGO2_Rev		CATACCTCTAGAAGTGAGGATCAC	
NbGAPDH_For	Gliceraldeído 3-fosfato	AGCTCAAGGAAATTCTCGATG	Zhang et al. 2023a
NbGAPDH_Rev	desidrogenase	AACCTTAACCATGTCATCTCC	
NbPP2A_For	Proteína fosfatase 2a	TGCCTGTGGTTATTACTGC	Liu et al. 2012
NbPP2A_Rev		AGACTGAAGTGCTTGATTGG	

4. Resultados

4.1 Detecção de peróxido de hidrogênio em *Nicotiana benthamiana* nos clones 2 e 4 do PepRSV

Neste ensaio, o objetivo foi avaliar a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um tipo de espécie reativa de oxigênio advinda de estresse oxidativo, em *N.benthamiana* durante a infecção com o clone 4 de PepRSV e compará-la com a resposta de plantas inoculadas com o clone 2 do mesmo vírus. A produção de H_2O_2 é associada a respostas de resistência mediadas por hipersensibilidade (HR-like), que ocorrem durante a interação planta-patógeno. Para a detecção de H_2O_2 , utilizou-se a coloração com DAB (3,3'-diaminobenzidina), conforme descrito por Daudi et al. (2012) e Qiu et al. (2021), com algumas adaptações. O experimento foi conduzido em *N. benthamiana* agroinfiltrada com os clones 2 e 4 de PepRSV, além dos controles (plasmídeo vazio pJL89 e solução de agroinfiltração), ressaltando que as folhas foram infiltradas nas quatro extremidades da folha. Vale ressaltar que, em todos os resultados descritos a seguir, o RNA1 (isolado CAM) foi sempre agroinfiltrado juntamente com o RNA2 do clone 2 ou do clone 4 de PepRSV na mesma planta, para garantir o estabelecimento do processo de infecção. Assim, para simplificação e como explicado anteriormente, o conjunto RNA1 + RNA2 do clone 2 será referido como “clone 2” (infecção sistêmica (Figura 6F)) e o conjunto RNA1 + RNA2 do clone 4 será denominado “clone 4” (lesões tipo “HR-like” (Figura 6E)). As folhas foram analisadas em três diferentes tempos 24, 48 e 72 h.p.i. Nos resultados, observou-se a formação de H_2O_2 nas quatro extremidades da folha agroinfiltrada nas folhas de *N. benthamiana* inoculadas com o clone 4 de PepRSV (Figura 6A). A coloração se intensificou ao longo das horas, sendo que em 72 h.p.i. apresentou a coloração mais intensa e, com uma intensidade visível e similar em 24 e 48 h.p.i, sugerindo um aumento progressivo na deposição de H_2O_2 à medida que a infecção se

estabelecia. As lesões causadas pela resposta do tipo hipersensibilidade podem ser visíveis no clone 4 somente 72 h.p.i., refletindo um aumento na produção de H₂O₂ associado a esse tipo de resposta imune. Em contraste, nas folhas sadias e (Figura 6C) inoculadas com o plasmídeo vazio (Figura 6D) não foi observada a formação de H₂O₂ visualmente em nenhum dos tempos (24, 48 e 72 h.p.i.) (Figura 6B). Em plantas inoculadas com o clone 2 de PepRSV as colorações foram fracas ou inexistentes, o que sugere que o clone 2 não desencadeia uma resposta semelhante de produção de H₂O₂ durante o mesmo período de infecção do clone 4.

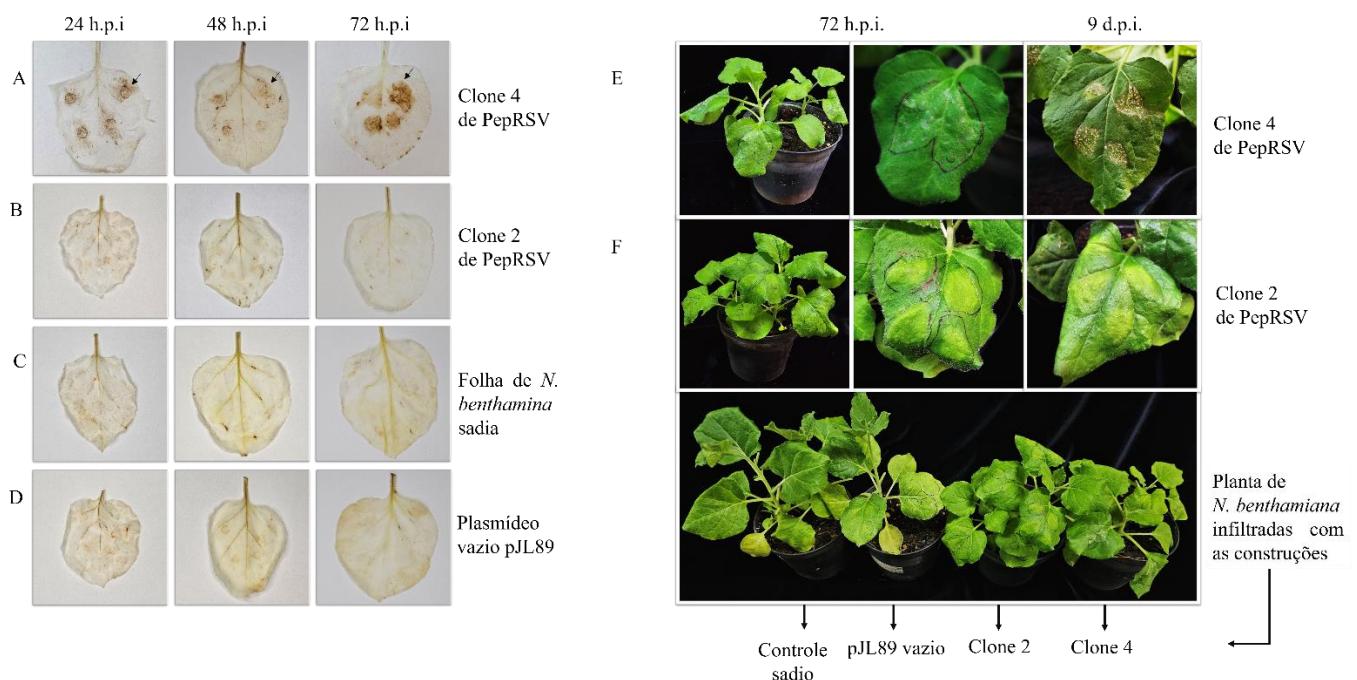


Figura 6. Folhas de *N. benthamiana* coradas com DAB e descoradas com tampão (glicerol:metanol:etanol) para detecção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), um tipo de espécie reativa de oxigênio. (A) Folhas infiltradas com o clone 4 de PepRSV, com presença de H₂O₂ detectada em 24, 48 e 72 horas pós-infiltariação (h.p.i.) destacadas com as setas (↗). (B) Folhas infiltradas com o clone 2 de PepRSV, onde não houve detecção de H₂O₂ em 24, 48 e 72 h.p.i.. (C) Folhas de sadias sem detecção de H₂O₂ em 24, 48 e 72 h.p.i.. (D) Folhas infiltradas com o plasmídeo vazio pJL89, sem detecção de H₂O₂ em 24, 48 e 72 h.p.i..

4.2 Detecção de deposição de calose em *N. benthamiana* agroinfiltradas com os clones 2 e 4 do PepRSV

Este ensaio avaliou a deposição de calose em folhas de *N. benthamiana* após agroinfilação com os clones 2 e 4 do PepRSV, além de um controle utilizando o

plasmídeo pJL89 vazio. As coletas das folhas foram feitas em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 h.p.i.), a fim de monitorar a dinâmica da resposta da planta ao PepRSV. A formação de calose nas células vegetais está associada a respostas de defesa contra patógenos, frequentemente mediadas pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A coloração com azul de anilina foi utilizada para visualizar a deposição de calose, que permite a visualização dos pontos de calose (pontos azuis), sob microscopia de fluorescência. A análise das folhas infiltradas com o plasmídeo pJL89 vazio e somente tampão de inoculação não revelou a presença de pontos azuis (Figura 7C, D), sugerindo que o vetor utilizado não teve efeito sobre a formação de calose. Por outro lado, as folhas infiltradas com os clones 2 e 4 de PepRSV apresentaram pontos azuis (Figura 7 A, B) indicativos da deposição de calose, principalmente nas 24 horas após a infiltração. Esses pontos foram visíveis nas duas primeiras coletas (24 e 48 h.p.i.), com maior intensidade observada no primeiro tempo de 24 h.p.i., sugerindo uma resposta rápida e intensa da planta ao PepRSV. No entanto, a intensidade dessa deposição diminuiu nas 48 h.p.i. para ambos os clones. Não foi possível realizar a detecção da deposição de calose nas folhas coletadas as 72 h.p.i., uma vez que o tecido já apresentava sinais de formação de “HR-like” (hipersensibilidade), o que causou danos significativos no tecido e comprometeu o processo de coloração. Assim, a ausência de deposição de calose no controle reforça a ideia de que a resposta observada nos clones 2 e 4 é específica à infecção por PepRSV e não um artefato do processo de agroinfiltração ou do vetor. Vale ressaltar que não foi observada a deposição de calose em toda a folha, somente na região que foi agroinfiltrada.

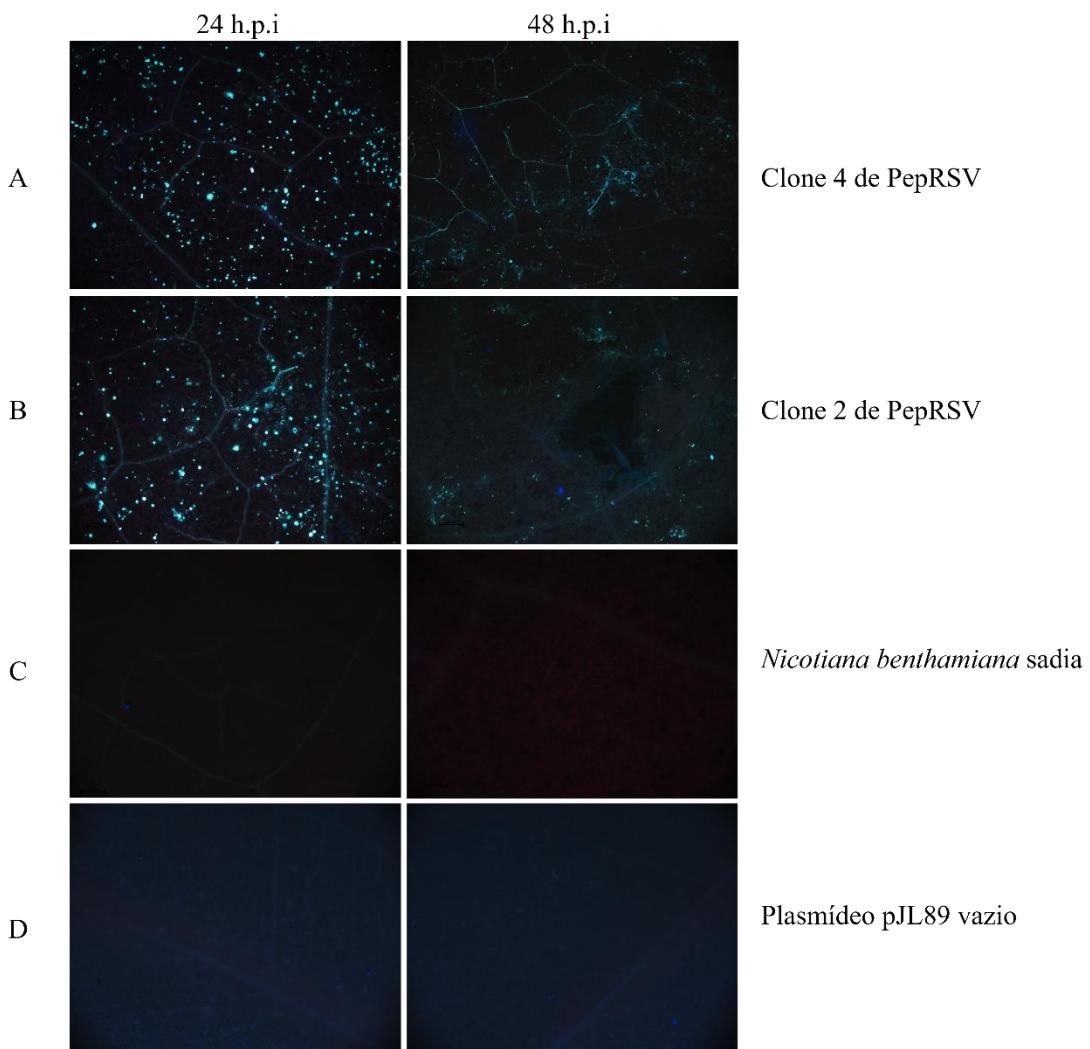


Figura 7. Imagens de tecido foliar de *N. benthamiana* corados com azul de anilina para detecção de deposição de calose sob microscopia de fluorescência. (A) Folhas infiltradas com o clone 4 de PepRSV, com presença de calose detectada em 24 e 48 horas pós-infiltração (h.p.i.). (B) Folhas infiltradas com o clone 2 de PepRSV, onde houve detecção de calose em 24 e 48 h.p.i.. (C) Folhas infiltradas com tampão de inoculação (D) Folhas infiltradas com o plasmídeo vazio pJL89, sem detecção de calose em 24 e 48 h.p.i..

4.3 Nocaute do gene SGT1 (supressor do alelo G2 de skp1) de *N. benthamiana*

Os resultados do experimento visaram investigar a resposta de plantas de *N. benthamiana* à infiltração com o clone 4 do PepRSV, utilizando o clone 2 como controle, com ênfase na possibilidade de determinar se a resposta “HR-like” é mediada por PTI ou ETI. Para isso, foi realizado o silenciamento do gene SGT1, essencial para a ativação de NLRs e indução de resposta HR, com intuito de excluir a via de ETI como mediadora da resposta observada. A proteína SGT1 desempenha um papel crucial na estabilidade e

ativação dos NLRs, que são responsáveis pela resistência das plantas contra patógenos (Wu et al. 2017). A clonagem do gene SGT1 no plasmídeo pgR107 (que foi utilizado para VIGS) foi confirmada por sequenciamento Sanger. Foram produzidos sete clones de VIGS-SGT1 para fins de teste, sendo confirmada a presença do VIGS-SGT1 nas plantas por RT-PCR. Após 72 h.p.i., foi possível observar a reação de “HR-like” causada pelo clone 4 nas folhas de *N. benthamiana*. O gráfico de expressão relativa do gene *SGT1*, gerado utilizando o software qBASE (Hellemans et al. 2007) (Figura 8), revelou uma redução na expressão desse gene em comparação com a planta sadia. No entanto, todas as plantas infiltradas com os clones VIGS-SGT1 exibiram variação na expressão do gene *SGT1* (Figura 8). A redução mais pronunciada foi observada nos clones C3, C6, C9, sugerindo que o silenciamento do gene *SGT1* pode ter ocorrido para todos os clones gerados. Entretanto, essa variação da expressão do gene, apresentada no gráfico, pode estar relacionada a diferenças experimentais. Para consolidar esses resultados e garantir a precisão da interpretação, é imprescindível normalizar os valores de expressão relativa utilizando genes de referência adequados. No presente estudo, os genes selecionados para normalização ainda não apresentaram valores de estabilidade gênica satisfatórios, conforme indicado pelos coeficientes de variação e os valores do GeNorm. A normalização é fundamental para controlar possíveis variações experimentais ou técnicas, assegurando que as diferenças observadas na expressão do gene *SGT1* sejam de fato atribuídas ao silenciamento e não a outros fatores experimentais. Embora a reação de “HR-like” tenha permanecido nas plantas inoculadas com o clone 4, a redução da expressão de gene *SGT1* ainda não permite excluir a possibilidade da via ETI esteja presente. São necessários mais testes e aprimoramento da experimentação.

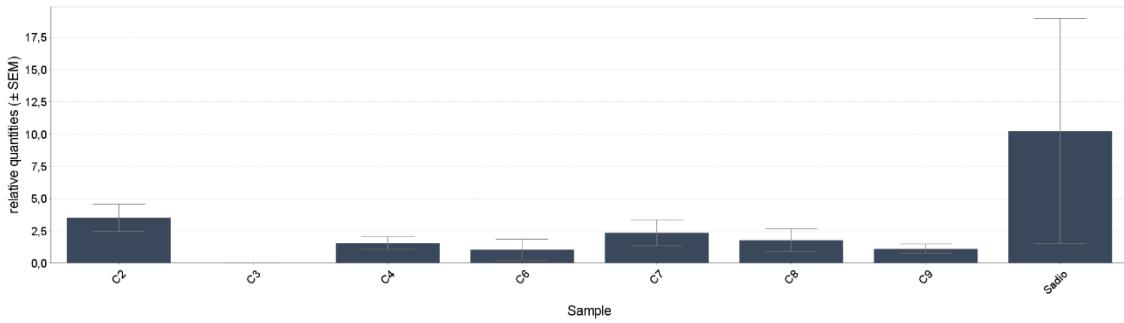


Figura 8. Gráfico da expressão relativa do gene SGT1 em diferentes amostras de *Nicotiana benthamiana*. As barras representam a média das quantidades relativas de transcritos no período de 24 e 48 h.p.i. (C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 e Sadio). A designação “C” refere-se a “clone”.

4.4 Avaliação da estabilidade gênica e seleção de genes de referência para a interação PepRSV/*N. benthamiana*

Neste estudo, avaliou-se a interação entre *N. benthamiana* e os clones 2 e 4 do PepRSV, coletando amostras de folhas em dois tempos: 24 e 48 h.p.i.. O objetivo foi identificar genes de referência estáveis para normalizar a expressão dos genes WRKY1, ACRE132 e SGT1, envolvidos na resposta imune de *N. benthamiana*. A seleção dos genes de referência seguiu critérios estabelecidos em estudos anteriores (Liu et al., 2012; Zhang et al., 2023a), com foco em genes essenciais e amplamente utilizados em RT-qPCR para plantas. Os candidatos selecionados foram: ACT, AGO2, EF1A, GAPDH, L23, PP2A, Tsanp, F-box e UB, que desempenham papéis diversos como metabolismo (ACT, EF1A), processamento de RNA (AGO2), estrutura celular (L23, Tsanp), e transporte e sinalização (PP2A, F-box, UB). A diversidade desses genes visa garantir uma normalização robusta nas condições experimentais. Conforme recomendado por Vandesompele et al. (2002), a normalização deve envolver pelo menos três genes de referência. A estabilidade dos genes foi analisada com o software geNorm, que calcula o valor de estabilidade gênica (GeNorm M). Os valores de coeficiente de variação (V) devem ser <0,25 e os valores de M-value (M) devem ser <0,5. A análise mostrou que os genes ACT, L23 e Tsanp apresentaram boa estabilidade, com ACT e Tsanp destacando-se por valores de CV

adequados com 0,166 e 0,127, respectivamente. O gene L23 apresentou o valor de 0,3 de CV não adequado para o ensaio. Por outro lado, os genes AGO2 e GAPDH apresentaram elevados CV, indicando instabilidade na expressão e tornando-os inadequados para a normalização neste estudo. EF1A e GAPDH também não atenderam aos critérios de estabilidade necessários. Os genes PP2A e F-box apresentaram os maiores valores de M, um indicador de baixa estabilidade, o que os torna impróprios para normalização. A expressão dos genes WRKY1 e ACRE132 foi maior nas plantas infiltradas com o clone 4 de PepRSV (Figura 9 A, B), indicando uma resposta imunológica mais intensa, associada à morte celular programada (WRKY1) e à imunidade desencadeada por padrões (ACRE132). O clone 2 e a planta sadia apresentaram comportamento semelhante não mostrando quantidade relativa de transcritos para os genes WRKY1 e ACRE132 (Figura 9 A, B). As plantas infiltradas com *A. tumefaciens* contendo apenas o plasmídeo pJL89 apresentou expressão relativa para ambos os genes WRKY1 e ACRE132 (Figura 9 A, B), indicando possível reação da planta a agroinfiltração com *A. tumefaciens*. No entanto, os genes de referência avaliados não mostraram estabilidade suficiente para a normalização da expressão dos genes de interesse (WRKY1, ACRE132 e SGT1). A combinação de ACT e Tsapn demonstrou maior confiabilidade, mas ainda assim, novos genes de referência precisam ser considerados para garantir uma análise mais robusta. Assim, recomendamos a seleção de outros genes de referência, possivelmente com base em novos critérios biológicos ou a validação de novos candidatos em condições experimentais semelhantes.

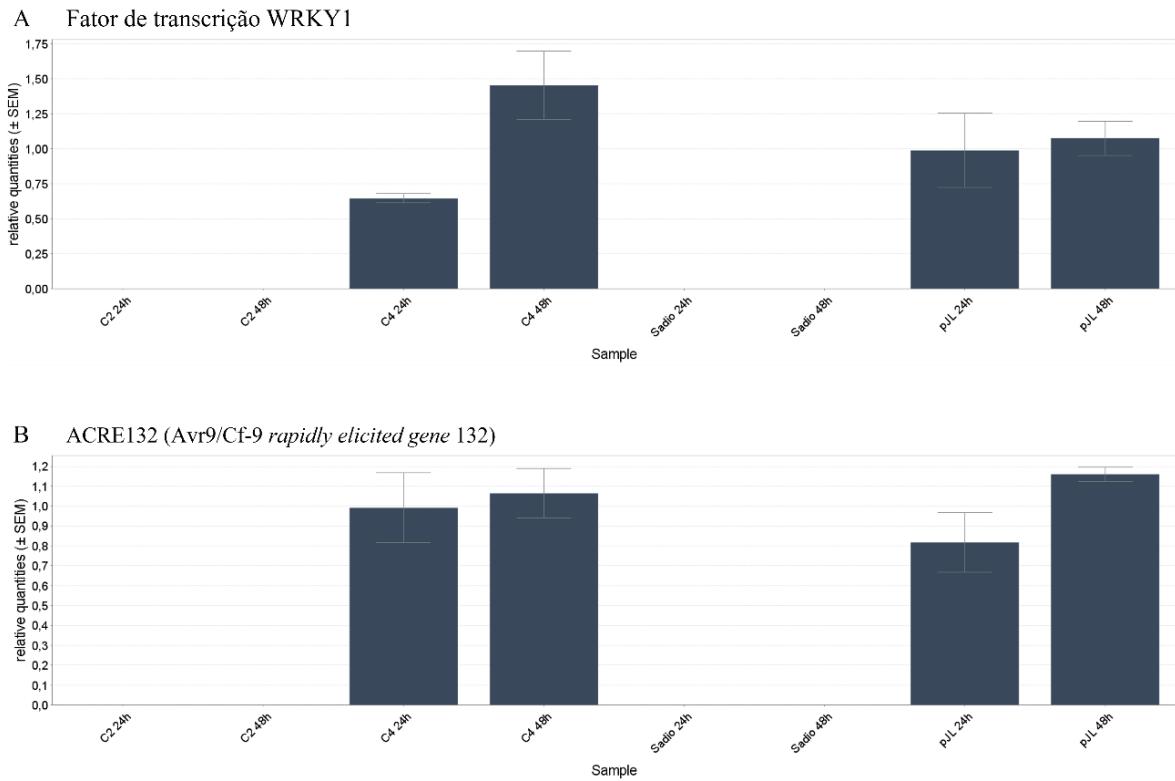


Figura 9. Gráfico da expressão relativa dos genes ACRE132 e WRKY1 em *Nicotiana benthamiana* durante a interação com o clone 2 (C2) e o clone 4 (C4) do PepRSV, utilizando planta sadia e o plasmídeo pJL89 vazio como controles. A expressão relativa dos genes ACRE132 e WRKY1 foi avaliada por RT-qPCR. As barras representam a média das quantidades relativas de transcritos no período de 24 e 48 h.p.i

5. Discussão

Neste estudo, investigamos a resposta imune de *N. benthamiana* após infecção com o clone 4 de PepRSV, utilizando o clone 2 para comparação. O clone 2 é conhecido por causar infecção sistêmica nas plantas, enquanto o clone 4 induz lesões locais, uma característica típica da resposta hipersensível (*HR-like*). A morte celular “*HR-like*” é uma forma de morte celular programada comum em plantas, mas induzida por vários fatores, o que torna a sua compreensão complexa. Nesse contexto, alguns cientistas adotaram o termo “morte celular semelhante à hipersensibilidade”, para descrever unicamente a morte celular, ainda estabelecer uma conexão clara com genes *R*, resposta de defesa ou resistência a doenças. Esse termo ressalta que as diferentes reações de *HR* não são idênticas e podem ser ativadas por diversos estímulos (Balint-Kurti 2019).

A deposição de calose foi observada nas folhas infiltradas com ambos os clones de PepRSV, especialmente nas primeiras 24 h.p.i.. O íon Ca²⁺ atua como um mensageiro secundário universal em todos os organismos eucarióticos (Dodd et al. 2010). O aumento na concentração de Ca²⁺ pode ativar proteínas sensíveis ao cálcio, como calmodulinas e proteínas quinases dependentes de cálcio (Dodd et al. 2010; Yu et al. 2024). O influxo de Ca²⁺ regula a sinalização de defesa, incluindo a ROS e a ativação de processos que levam à deposição de calose. Quando as plantas são expostas a condições ambientais adversas ou à invasão de patógenos, o acúmulo de calose é intensificado como parte de uma resposta defensiva, auxiliando no reforço das paredes celulares e na restrição da propagação de patógenos, contribuindo para a integridade estrutural e a resistência a estresses bióticos e abióticos (Luna et al. 2011; Chen et al. 2024). Recentemente, Wu et al. (2020) identificaram uma quinase receptora com domínios de repetições ricas em leucina, denominada HPCA (hydrogen-peroxide-induced Ca²⁺ increases ou aumento de Ca²⁺ induzido por peróxido de hidrogênio), que atua como um sensor para detectar H₂O₂ extracelular, sendo que esse sensor desencadeia a ativação de canais de Ca²⁺, resultando em um influxo de íons de cálcio em *A. thaliana*. A formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), uma espécie reativa de oxigênio associada ao estresse oxidativo e à defesa contra patógenos, foi detectada em folhas infectadas pelo clone 4, indicando uma resposta mais forte e localizada do que as observadas nas folhas infectadas pelo clone 2. A produção de H₂O₂ em plantas infectadas pelo clone 4, que aumentou progressivamente ao longo do tempo (24, 48 e 72 h.p.i.), é consistente com as respostas de resistência mediadas pela hipersensibilidade, onde o acúmulo de ROS (espécies reativas de oxigênio) está intimamente relacionado à morte celular localizada. Esta constatação está alinhada com estudos anteriores, como os de Yoda et al. (2003) e Xu et al. (2024), que demonstraram que a morte celular programada associada ao acúmulo de ROS ocorre nas células

próximas ao ponto de infecção, atuando como um mecanismo de defesa para limitar a propagação do patógeno. As ROS, especialmente H₂O₂, desempenham um papel em provocar a inibição localizada de patógeno e estresse oxidativo, como já demostrado com o TMV, que com a aplicação de baixas concentrações de H₂O₂ em folhas de tabaco houve a supressão da necrose do tipo “HR-like” associado ao vírus (Hafez et al. 2012). Alguns estudos mostram que o *Hordeivirus hordei* (Yang et al. 2018), *Closterovirus tristezae* (Sun & Folimonova, 2019), *Bymovirus triticitessellati* (Zhang et al. 2023b), *Furovirus chinense* (Yang et al. 2024) influenciam o mecanismo de ROS quando infectam plantas. A detecção de H₂O₂, uma substância associada à resistência a patógenos, corroborou com a ideia de que o clone 4 está induzindo uma resposta imune mais intensa em comparação ao clone 2, que não causou o acúmulo de H₂O₂, somente de deposição de calose.

A investigação do papel do gene *SGT1*, essencial para a ativação de NLRs e a indução de resposta HR em *N. benthamiana*, é uma peça-chave para esse estudo. A possibilidade da redução na expressão do gene SGT1 nas plantas com silenciamento desse gene sugere que o clone 4 de PepRSV pode induzir uma resposta “HR-like” mediada por PTI e não por ETI, embora o silenciamento do SGT1 não tenha sido suficiente para excluir essa via completamente. Isso corrobora os achados de Yu et al. (2021), que ressaltaram a importância do SGT1 para a resposta HR em *N. benthamiana*. A SGT1 é essencial para garantir a funcionalidade do gene Sw-5b, que confere resistência ao *Orthotospovirus tomatomaculae* em tomateiro (Chen et al. 2021), além de ser fundamental para o estabelecimento de ETI a partir da resposta hipersensível (HR) mediada por Sw-5b (Wu et al. 2017). A SGT1 não é necessária para as respostas de PTI em *N. benthamiana* ou *Arabidopsis thaliana* (Yu et al. 2021), o que é semelhante ao que foi observado nas proteínas NRC (NLR-required for cell death) do tomate (Wu et al. 2017). A detecção de uma resposta de tipo “HR-like” no clone 4 está em consonância

com os resultados de ROS e calose, e sugere que esse clone induz uma resposta de imunidade mais forte do que o clone 2, possivelmente por apresentar um *frameshift* no gene da capa proteica ou estrutura que desencadeia a ativação de receptores de forma mais eficiente. A presença da resposta de HR-like no clone 4 e sua ausência no clone 2 indicam uma diferença funcional no mecanismo de reconhecimento de padrões patogênicos entre os dois clones.

Os resultados de expressão dos genes WRKY1 e ACRE132, que desempenham papéis cruciais na morte celular programada e na resposta de imunidade induzida por padrões, também indicam uma resposta mais intensa ao clone 4. A expressão desses genes foi mais pronunciada nas plantas infectadas com o clone 4, sugerindo que o clone 4 está ativando uma resposta de defesa mediada por PTI e/ou ETI, relacionada à morte celular programada e à ativação de mecanismos de imunidade. O gene WRKY1 (fator de transcrição WRKY1), por exemplo, é conhecido por sua capacidade de regular a expressão de genes relacionados à defesa e resistência a infecções virais, como por exemplo, Sun e colaboradores (2023) sugerem que WRKY1 de *N. benthamiana* regula positivamente a defesa da planta à infecção por geminivírus. Estudos com o *Citlodavirus citri* (*Citlodavirus*), revelou que a “HR-like” foi inibida em *N. benthamiana* silenciada por WRKY1, sugerindo que o WRKY1 regulou positivamente a morte celular induzida pelo vírus na planta (Qin et al. 2023). O gene ACRE132 (Avr9/Cf-9 rapidly elicited gene 132) é um regulador na resposta hipersensível (HR), em *N. tabacum*, sua expressão é induzida rapidamente em resposta à interação entre a proteína efetora Avr9 de patógenos e o gene de resistência Cf-9 (Rowland et al. 2005). Heese e colaboradores (2007) usaram bancos de dados públicos de *microarray* e identificaram genes marcadores que são rápida e transitoriamente regulados positivamente após o tratamento com PAMP em *N. benthamiana*, como NbCYP71D20, NbACRE31 e NbACRE132. A capa proteica do

Potyvirus plumpoxi suprime a PTI em plantas de *N. benthamiana*, sendo o ACRE132 um gene marcador de PTI importante no tratamento com PAMP (Nicaise & Candresse, 2016). Embora os resultados tenham fornecido *insights* valiosos sobre os mecanismos de defesa de *N. benthamiana* frente à infecção com PepRSV, alguns aspectos ainda precisam ser esclarecidos. A estabilização da expressão do gene SGT1 e a exclusão da via de ETI, bem como a realização de experimentos adicionais para verificar o papel de peptídeos específicos da CP do PepRSV no desencadeamento da resposta HR-like, são necessários para validar completamente as conclusões obtidas. Além disso, a análise de outros genes de referência e a melhoria da normalização de dados serão essenciais para obter uma análise mais robusta e confiável da expressão gênica.

6. Conclusão

Este estudo proporcionou uma análise inicial da interação entre *Nicotiana benthamiana* e PepRSV, destacando a diferenciação nas respostas imunes induzidas pelos clones 2 e 4 do PepRSV. O clone 4 induziu uma resposta mais intensificada de tipo “HR-like”, associada à produção de H₂O₂, deposição de calose e ativação dos genes WRKY1 e ACRE132, evidências de uma resposta imune mais robusta. O silenciamento do gene SGT1 e o estudo do papel dos peptídeos do *frameshift* da CP podem fornecer mais esclarecimentos sobre os mecanismos de reconhecimento e ativação dessa resposta. A continuidade deste estudo, com a otimização da análise de expressão gênica e a investigação adicional sobre os peptídeos do vírus, será essencial para avançar no entendimento das interações virais e da resistência das plantas a PepRSV.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, I. A., FRANCA, L. V., KAUFFMANN, C. M., et al. Practical use of tobaviruses-based vector to produce SARS-CoV-2 antigens in plants. **Journal of Virological Methods** 315:114710, 2023.
- BALINT-KURTI, P. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 8, p. 1163-1178, 2019.
- BIGEARD, J.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). **Molecular plant**, 8(4), 521-539, 2015.
- BUCHER, E.; SIJEN, T.; HAAN, P. DE; GOLDBACH, R.; PRINS, M. Negative-Strand Tospoviruses and Tenuiviruses Carry a Gene for a Suppressor of Gene Silencing at Analogous Genomic Positions. **Journal of Virology**, v.77, p.1329, 2003.
- CHAPMAN, Sean; KAVANAGH, Tony; BAULCOMBE, David. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. **The Plant Journal**, v. 2, n. 4, p. 549-557, 1992.
- CHEN, Z.; WU, Q.; TONG, C.; CHEN, H.; MIAO, D.; QIAN, X.; ZHAO, X.; JIANG, L.; TAO, X. Characterization of the roles of SGT1/RAR1, EDS1/NDR1, NPR1, and NRC/ADR1/NRG1 in Sw-5b-mediated resistance to tomato spotted wilt virus. **Viruses**, 13(8), 1447, 2021.
- CHEN, J. et al. Plasmodesmata function and callose deposition in plant disease defense. **Plants**, v. 13, n. 16, p. 2242, 2024.
- DAS, K. & ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, 2, 53, 2014.
- DAUDI, A.; CHENG, Z.; O'BRIEN, J.A.; MAMMARELLA, N.; KHAN, S.; AUSUBEL, F. M.; BOLWELL, G. P. The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern-triggered immunity. **The Plant Cell**, 24(1), 275-287, 2012.
- DODD, AN.; KUDLA, J.; SANDERS, D. The language of calcium signaling. **Annual Review of Plant Biology**, 61(1),593-620, 2010.
- FOGAÇA, M. B. T.; LOPES-LUZ, L.; SAAVEDRA, D. P. et al. Production of antigens expressed in *Nicotiana benthamiana* plant and *Escherichia coli* for the SARS-CoV-2 IgG antibody detection by ELISA. **Journal of Virological Methods**, 114969, 2024.
- FOLIMONOVA, S.Y. & SUN, YONG-DUO. Citrus tristeza virus: From pathogen to panacea. **Annual Review of Virology**, 9(1)417-435, 2022.
- HAFEZ, Y. M.; BACSÓ, R.; KIRÁLY, Z.; KÜNSTLER, A.; KIRÁLY, L. Up-regulation of antioxidants in tobacco by low concentrations of H₂O₂ suppresses necrotic disease symptoms. **Phytopathology**, 102(9), 848-856, 2012.

HEESE, A.; HANN, D. R.; GIMENEZ-IBANEZ, S. et al. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 104(29), 12217-12222, 2007.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; PAEPE, A. de; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. QBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, v. 8, n. 2, R19, 2007.

HERNÁNDEZ, J. A.; GULLNER, G.; CLEMENTE-MORENO, M. J.; KÜNSTLER, A.; JUHÁSZ, C.; DÍAZ-VIVANCOS, P.; KIRÁLY, L. Oxidative stress and antioxidative responses in plant–virus interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 94, 134-148, 2016.

KAUFFMANN, C. M.; VENDRAMINI, M.; BATISTA, A. M. et al. Specific antibody production using recombinant proteins to elucidate seed transmission and nuclear localization of *Coguvirus citrulli* and *Coguvirus henanense* in radicles of watermelon crop. **Journal of Virological Methods**, 325, 114886, 2024.

KOURELIS, J. VAN DER HOORN, R. A. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. **The Plant Cell**, 30(2), 285-299, 2018.

KUMAR, G. & DASGUPTA, I. Dynamics of reactive oxygen species metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) following infection with rice tungro bacilliform virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 102342, 2024.

LIU, D.; SHI, L.; HAN, C.; YU, J.; LI, D.; ZHANG, Y. Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. **PLoS pathogens** e46451, 2012.

LUNA, E.; PASTOR, V.; ROBERT, J.; FLORS, V.; MAUCH-MANI, B.; TON, J. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 24(2), 183-93, 2011.

MASON, K. N.; EKANAYAKE, G.; HEESE, A. Staining and automated image quantification of callose in *Arabidopsis* cotyledons and leaves. In: **Methods in cell biology**. Academic Press. p. 181-199, 2020.

NGOU, B. P. M.; DING, P.; JONES, J. D. Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. **The Plant Cell**, 34(5), 1447-1478, 2022.

NICAISE, V. & CANDRESSE, T. Plum pox virus capsid protein suppresses plant pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity. **Molecular plant Pathology**, 18(6), 878-886, 2016.

PIAU, M. & SCHMITT-KEICHINGER, C. The Hypersensitive Response to Plant Viruses. **Viruses**, 15(10), 2000, 2023.

QIN, Y.; ZHAO, J.; WANG, J.; YE, X.; ZHOU, C. ZHOU, Y. Regulation of *Nicotiana benthamiana* cell death induced by citrus chlorotic dwarf-associated virus-RepA protein by WRKY 1. **Frontiers in Plant Science**, 14, 1164416, 2023.

QIU, S.; CHEN, X.; ZHAI, Y., Downregulation of light-harvesting complex II induces ROS-mediated defense against turnip mosaic virus infection in *Nicotiana benthamiana*. **Frontiers in Microbiology**, 12, 690988, 2021.

ROWLAND, O.; LUDWIG, A. A.; MERRICK, C. J. et al. Functional analysis of Avr9/Cf-9 rapidly elicited genes identifies a protein kinase, ACIK1, that is essential for full Cf-9-dependent disease resistance in tomato. **The Plant Cell**, 17(1), 295-310, 2005.

SUN, S.; LI, S.; ZHOU, X.; YANG, X. WRKY1 represses the WHIRLY1 transcription factor to positively regulate plant defense against geminivirus infection. **PLoS Pathogens**, 19(4), e1011319, 2023.

TAVARES-ESASHIKA, M.L. TESE: CONSTRUÇÃO DO CLONE INFECCIOSO E VETOR VIRAL DE PEPPER RINGSPOT VIRUS. 2021. 114p. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.

TAVARES-ESASHIKA, M. L.; CAMPOS, R. N. S.; MAEDA, M. H. K. et al. Development of a heterologous gene expression vector in plants based on an infectious clone of a tobaviruses, pepper ringspot virus. **Annals of Applied Biology**, 181(1), 107-116, 2022.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, 3, 1-12, 2002.

WU, C. H.; ABD-EL-HALIEM, A.; BOZKURT, T. O. et al. NLR network mediates immunity to diverse plant pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 114(30), 8113-8118, 2017.

WU, C.H.; ADACHI, H.; DE LA CONCEPCION, J.C.; CASTELLS-GRAELLS, R.; NEKRASOV, V.; KAMOUN, S. NRC4 gene cluster is not essential for bacterial flagellin-triggered immunity. **Plant Physiology**, 182(1):455-9, 2020.

XU, Y., ZHANG, S., ZHANG, M., JIAO, S., GUO, Y., JIANG, T. The role of reactive oxygen species in plant-virus interactions. **Plant Cell Reports**, 43(8), 197, 2024.

YANG, M., LI, Z., ZHANG, K. et al. Barley stripe mosaic virus γb interacts with glycolate oxidase and inhibits peroxisomal ROS production to facilitate virus infection. **Molecular Plant**, 11(2), 338-341, 2018.

YANG, J.; CHEN, L.; ZHANG, J. et al. TaTHI2 interacts with Ca²⁺-dependent protein kinase TaCPK5 to suppress virus infection by regulating ROS accumulation. **Plant Biotechnology Journal**, 22(5), 1335-1351, 2024.

YODA, H.; YAMAGUCHI, Y.; SANO, H. Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. **Plant Physiology**, 132(4), 1973-1981, 2003.

YU, G., XIAN, L., ZHUANG, H., MACHO, A. P. SGT1 is not required for plant LRR-RLK-mediated immunity. **Molecular Plant Pathology**, 22(1), 145-150, 2021.

YU, X. Q.; NIU, H. Q.; LIU, C.; WANG, H. L.; YIN, W.; XIA, X. PTI-ETI synergistic signal mechanisms in plant immunity. **Plant Biotechnology Journal**, 22:8, 2024.

YUAN, M.; NGOU, B. P. M.; DING, P.; XIN, X. F. PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, 62, 102030, 2021.

ZHANG, G., ZHANG, Z., WAN, Q., ZHOU, H., JIAO, M., ZHENG, H. & WU, J. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis of gene expression in *Nicotiana benthamiana* upon single infections by 11 positive-sense single-stranded RNA viruses from Four Genera. **Plants**, 12(4), 857, 2023a.

ZHANG, T.; HU, H.; WANG, Z.; et al. *Wheat yellow mosaic virus* NiB targets TaVTC2 to elicit broad-spectrum pathogen resistance in wheat. **Plant Biotechnology Journal**, (5):1073-88, 2023b.

ZHOU, J. M. & ZHANG, Y. Plant immunity: danger perception and signaling. **Cell**, 181(5), 978-989, 2020.

CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Desempenho dos antissoros: A produção de antissoros contra os vírus WCLaVs demonstrou uma boa sensibilidade e especificidade, com um problema resolvido por absorção cruzada, o que é uma grande conquista, pois permite a diferenciação de tipos virais relacionados. Isso contribui para o diagnóstico e controle das infecções virais de forma mais eficiente.
2. Avanços na compreensão da transmissão e distribuição do vírus: A validação da transmissão de WCLaVs por sementes, a distribuição do vírus nas plantas e a localização subcelular do WCLaV-1 oferecem insights importantes sobre o comportamento e a propagação do vírus, essencial para o manejo fitossanitário. Isso pode ser útil para desenvolver estratégias de controle mais eficazes.
3. Sistema de expressão transiente com PepRSV: O uso do sistema de expressão transiente baseado no vetor viral PepRSV mostrou ser uma ferramenta valiosa para a expressão dos genes do nucleocapsídeo de WCLaVs em *Nicotiana benthamiana*, o que abre portas para pesquisas adicionais. No entanto, a necessidade de ajustes para otimizar o sistema aponta para um espaço para aprimoramentos no uso dessa ferramenta biotecnológica.
4. Resposta imune induzida pelo PepRSV: A observação de uma resposta “HR-like” após a inoculação com o clone 4 de PepRSV sugere que o mecanismo de defesa das plantas pode não ser mediado por ETI, e sim por PTI. O fato de o nocaute do gene SGT1 não impedir a resposta indica que outros caminhos de sinalização podem estar envolvidos.
5. Melhor compreensão do mecanismo de resposta “HR-like”: O entendimento completo do mecanismo que leva à indução das lesões locais após a infecção

com o clone 4 de PepRSV requer mais estudos sobre as vias de sinalização envolvidas, especialmente a relação com a liberação de ROS e o papel do gene SGT1. Estudos adicionais poderão esclarecer se esse processo envolve uma forma de resistência primária mediada por PAMPs (PTI) ou se é um caminho alternativo de defesa.

6. Aprimoramento da ferramenta PepRSV: O vetor viral PepRSV se mostrou promissor, mas ajustes no protocolo de utilização são necessários para aumentar sua eficiência e aplicabilidade em outros contextos. Melhorias no controle da expressão transiente e no entendimento dos mecanismos de defesa induzidos pelo vetor permitirão o uso mais amplo dessa ferramenta em diferentes espécies vegetais ou tratamentos para doenças virais.

PRODUÇÃO DURANTE O DOUTORADO

Neste item estão listados trabalhos de primeira autoria e colaborações que não fizeram parte do texto principal. Esses trabalhos apresentam a descrição e caracterização de novos vírus vegetais e produção de antígeno viral.

1. Kauffmann, C. M., Boari, A. J., Silva, J. M. F., Blawid, R., Nagata, T. 2022. Complete genome sequence of patchouli chlorosis-associated cytorhabdovirus, a new cytorhabdovirus infecting patchouli plants in Brazil. **Archives of Virology**, 167(12), 2817-2820.
2. Kauffmann, C. M., de Jesus Boari, A., Silva, J. M. F., Blawid, R., Nagata, T. 2023. Complete genome sequence of mimosa mosaic virus, a new sobemovirus infecting Mimosa sensitiva L. **Archives of Virology**, 168(1), 28.
3. Kauffmann, C. M., Boari, A. J., Silva, J. M., Blawid, R., Kitajima, E. W., Nagata, T. 2023. Detection, characterization, and occurrence of black pepper virus F in black pepper plants in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, 48(3), 347-351.
4. Kauffmann, C. M., de Jesus Boari, A., Silva, B. A., de Moraes, I. J., dos Santos Cárdenas, S. B., do Vale Batista, A. M., Mota, H. B. da Silva, Queiroz, P. S., Pantoja, K. F. C., Marchi, B. R., Assis, G. M. L., Krauke-Sakate, R., Nagata, T. (2024). Arachis mottle-associated virus, a new polerovirus infecting Pinto peanut. **Archives of Virology**, 169(12), 247.
5. Boari, A. J., Cordovil, G. A., Kauffmann, C. M., Gavinho, B. E., Quadros, A. F., Pantoja, K. F., Junior, R.A.G., Oliveira, R.P.; Kitajima, E. W. 2022. Bean common mosaic virus infecting manteiguinha cowpea (*Vigna unguiculata*): seed transmission, evaluation of yield loss, and genetic resistance. **Tropical Plant Pathology**, 47(3), 450-455.
6. Maeda, M. H. K., Koyama, L. H. H., Campos, R. N. S., Kauffmann, C. M., Souza, J. O., Gilbertson, R., Inoue-Nagata A.K.; Freitas, D.M.S.; Nogueira, D.R.S.; Melo, F.L.; Nagata, T. 2022. First report of watermelon crinkle leaf-associated virus 1 and 2 infecting watermelon (*Citrullus lanatus*) plants in Brazil. **Plant disease**, 106(2), 773.
7. Andrade, I. A., Franca, L. V., Kauffmann, C. M., Maeda, M. H. K., Koyama, L. H. H., Hamann, P. R. V. et al. 2023. Practical use of tobaviruses-based vector to produce SARS-CoV-2 antigens in plants. **Journal of Virological Methods**, 315, 114710.
8. Silva, B. A., Kauffmann, C. M., Mota, H. B. S., Queiroz, P. S., Batista, A. M. V., Cardenas, S. B. S., Freitas, D.M.S., Nagata, T. 2024. First report of Moroccan watermelon mosaic virus in pumpkin plants in Brazil. **Plant Disease**, 108(2), 539.