

Camila de Moraes Rêgo-Machado  
Francisco de Assis dos Santos Diniz  
Alice Kazuko Inoue-Nagata  
Eduardo Chumbinho de Andrade  
Thaís Ribeiro Santiago

## 1. Introdução

Fitopatógenos causam sérios problemas em culturas de exploração agrícola, resultando em redução substancial na produtividade e na qualidade final do produto. Estima-se que cerca de 10 a 16% do custo de produção de uma lavoura é destinado aos gastos para controle de doenças (Strange & Scott, 2005; Oerke, 2006; Savary et al., 2019). Atualmente, a principal medida utilizada para o manejo de fitopatógenos consiste na aplicação de produtos agroquímicos, porém, esta estratégia, além de contribuir para o aumento do custo de produção, pode resultar na emergência de isolados resistentes ou tolerantes ao princípio ativo e também provocar danos ao meio ambiente, à saúde humana e aos animais (Nelson, 2020). Assim sendo, há uma forte demanda para o desenvolvimento de novas ferramentas que contribuam para o controle eficiente dos fitopatógenos de forma economicamente viável e ambientalmente sustentável.

Nos últimos anos, o fenômeno conhecido como RNA de interferência (*RNA interference*, RNAi) tem recebido grande destaque em nível mundial como potencial ferramenta para o controle de patógenos, por apresentar como principais características uma maior especificidade ao alvo, alta eficiência no controle e menor impacto sobre o ambiente (Rosa et al., 2018). RNAi é um mecanismo de regulação da expressão gênica e defesa antiviral em organismos eucariotos desencadeado pela presença de duplexes de RNA, comumente denominados como moléculas de RNA dupla fita (*double-strand RNA*, dsRNA), resultando no silenciamento gênico transcricional (*Transcriptional Gene Silencing*, TGS) e/ou pós-transcricional do gene homólogo (*Post-Transcriptional Gene Silencing*, PTGS) (Zhang et al., 2019).

A aplicação do mecanismo de RNAi para a proteção de plantas foi um dos grandes marcos para a agricultura na última década. O desenvolvimento de cultivares geneticamente modificadas expressando duplexes de RNA específicos de patógenos foi o método inicialmente utilizado para a produção das moléculas de RNA nas plantas visando a indução de RNAi e, conseqüentemente, a proteção contra a infecção por patógenos-alvos. Essa estratégia biotecnológica é conhecida como silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (*Host-Induced Gene Silencing*, HIGS) (Koch & Kogel, 2014). Nos últimos anos, muito se avançou no estudo sobre este tema e inúmeros trabalhos confirmaram a eficiência de HIGS para a proteção de plantas contra patógenos, notadamente via produção de plantas transgênicas (revisados por Ghag, 2017). Entretanto, o

processo de obtenção, avaliação e regulamentação de uma planta transgênica é demorado, com complicadas etapas de transformação, seleção e caracterização, seguido de um rígido protocolo de avaliação de biossegurança, além da existência de uma fração do público desfavorável a esta tecnologia.

Diante dessas barreiras, novas metodologias para entrega de duplexes de RNA têm sido estudadas visando a introdução direta de moléculas de forma exógena em plantas, isto é, a aplicação tópica das moléculas puras ou associadas a um agente carreador/estabilizante. O uso dessa estratégia apresenta vantagens importantes, como a rapidez no seu desenvolvimento, customização em seu desenho, otimização e produção, facilidade de aplicação e a maior aceitação pelos consumidores, por não envolver modificações genéticas artificiais. Contudo, a instabilidade das moléculas no ambiente e o seu custo são fatores ainda altamente limitantes (Fletcher et al., 2020). Felizmente, a síntese de dsRNAs está sendo barateada consideravelmente ao longo dos anos (Zotti et al., 2018). De acordo com nossas pesquisas, entre os anos de 2008 a 2020, o grama de dsRNA passou de US\$ 12.500 para US\$ 45. A redução do custo deve-se, principalmente, ao aprimoramento de métodos para a produção em larga escala de dsRNA com maior pureza e qualidade.

Acredita-se que a aplicação de produtos baseados em duplexes de RNA podem se tornar uma solução nova e/ou complementar ao manejo de fitopatógenos, com eficiência e especificidade superiores aos métodos convencionais (Joga et al., 2016; Zotti et al., 2018). Entretanto, desafios como a estabilidade das moléculas no ambiente, a entrega no sítio específico, a eficiência de proteção e o custo do produto ainda precisam ser superados para garantir não apenas uma função protetora, mas também o efeito sistêmico duradouro e curativo dos produtos. Neste capítulo, serão abordados o histórico da tecnologia de RNAi, a via de silenciamento gênico induzido com a aplicação tópica de RNA, além dos principais avanços na produção, entrega e efetividade das moléculas de RNA para o controle de fitopatógenos.

## 2. Histórico

Como muitas outras descobertas na ciência, o silenciamento gênico foi observado a partir de um resultado inesperado, com um experimento realizado por Matzke e colaboradores (1989) envolvendo a transformação de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) com duas construções. Neste trabalho, os autores transformaram tabaco com uma construção e, após seleção dos transformantes, realizaram uma segunda transformação. Então, eles observaram que a presença de um T-DNA afetava o estado de metilação e expressão de genes do segundo T-DNA. Mais tarde, Napoli e colaboradores (1990) observaram o fenômeno de silenciamento por RNA quando realizaram um estudo visando intensificar a coloração das flores de petúnia por meio da superexpressão de um gene endógeno que codifica a chalcona sintase (CHS), enzima associada à biossíntese de antocianinas. O objetivo era produzir flores quase negras. Para isso, os pesquisadores aumentaram o número de cópias do gene usando uma construção química da região codante de CHS via transgenia. Contudo, ao contrário do esperado,

o experimento resultou em linhagens transgênicas que produziam flores de petúnia com diferentes padrões de coloração, incluindo flores variegadas e totalmente brancas, resultantes aparentemente do silenciamento parcial ou total, respectivamente, dos transcritos de CHS. O fenômeno responsável pela redução no acúmulo do transcrito, tanto do transgene quanto do gene endógeno pré-existente nas plantas, foi denominado como cossupressão (Napoli et al., 1990).

Visando desvendar os mecanismos moleculares envolvidos nesse fenômeno, ensaios subsequentes demonstraram que plantas transgênicas com fenótipo de flores brancas continham um número similar de transcritos de CHS no núcleo quando comparadas com as plantas controles, porém, menor na região citoplasmática (Van Blokland et al., 1994). Essa nova descoberta constatada em petúnias foi denominada como PTGS, diferenciada de TGS cuja redução dos transcritos ocorre unicamente na região nuclear.

Paralelamente, estudos realizados em diversas instituições constataram que plantas geneticamente modificadas contendo fragmentos genômicos de fitopatógenos apresentavam resistência aos seus respectivos alvos. Em sua maioria, os trabalhos científicos tinham como objetivo a proteção de plantas contra viroses contendo uma cópia da região codificante da capa proteica (CP) viral inserida no material genético vegetal. Estas plantas apresentavam altos níveis de resistência à infecção pelos vírus homólogos (Lindbo & Dougherty, 1992; Lindbo et al., 1993). Sanford & Johnston (1985) nomearam o fenômeno como resistência derivada do patógeno (*Pathogen-Derived Resistance*, PDR).

Embora ambos os fenômenos, a supressão de gene endógeno em célula vegetal e a resistência à infecção viral, tenham como base o envolvimento das moléculas de RNA, a associação entre a cossupressão e PDR foi confirmada posteriormente com a utilização de vetores virais modificados expressando sequências homólogas aos genes endógenos de plantas (Ruiz et al., 1998). Esta descoberta demonstrou que os vírus internalizados na planta poderiam tanto induzir a proteção da planta como serem alvos de PTGS.

Ainda na década de 90, Romano & Macino (1992) verificaram que a regulação gênica mediada por RNA não era restrita apenas às plantas, mas também ocorria em fungos. Os pesquisadores reportaram que após a transformação de um isolado do organismo modelo *Neurospora crassa* com plasmídeo contendo duas cópias extras do gene *albino-1* (*al-1*), gene ligado à coloração alaranjada envolvida na síntese de carotenóide, observou-se colônias transgênicas com fenótipos semelhantes aos das estirpes com o gene mutado. Em fungos, o mecanismo de degradação citoplasmática dos transcritos, similar ao mecanismo de cossupressão em plantas relacionado ao PTGS, recebeu a denominação de *quelling* (repressão, em português). Além disso, estudos complementares demonstraram que a transformação de *N. crassa* expressando porções genômicas não codificantes, como promotores, não resultava na ocorrência de *quelling* (Cogoni et al., 1996).

Outros trabalhos importantes que contribuíram para uma melhor compreensão do mecanismo de silenciamento por RNA foram realizados por Guo & Kemphues (1995) e Fire et al. (1998) utilizando o nematoide modelo *Caenorhabditis elegans*. O primeiro trabalho constatou que a aplicação de injeções de RNA fita simples (*single-strand RNA*, ssRNA) antissenso no nematoide foi capaz de suprimir o acúmulo de mRNA complementar ao ssRNA. Neste mesmo estudo, experimentos adicionais comprovaram

que as moléculas de ssRNA, senso ou antissenso, eram capazes de silenciar o gene-alvo (Guo & Kemphues, 1995). Pouco foi explicado e detalhado sobre o fato observado, surgindo a necessidade de uma melhor averiguação até mesmo da possibilidade e consequência de hibridização das moléculas de RNA, resultando em dsRNAs.

Na tentativa de avançar na compreensão dos achados iniciais em *C. elegans*, Fire & colaboradores (1998) injetaram nos nematoides, separadamente, moléculas senso, anti-senso e dsRNA (senso e antisenso hibridizadas) com alta identidade a um gene essencial para os nematoides. Após as injeções, houve uma redução significativa na detecção do transcrito-alvo em todos os tratamentos, principalmente quando moléculas de dsRNA foram utilizadas. Assim, foi constatado o fenômeno de silenciamento gênico em nível pós-transcricional, sem alteração na sequência do DNA. Esse foi o primeiro relato de PTGS desencadeado por interferência de dsRNA e o fenômeno foi denominado de RNAi (Fire et al., 1998). A partir desses resultados, propôs-se que PTGS era ativado pela presença de duplexes de RNA, que, por sua vez, levavam à formação de um complexo proteico, naquele momento ainda não conhecido, responsável por escanear RNAs, encontrar sequências homólogas e degradá-las devido à sua atividade nucleolítica (Montgomery et al., 1998). Posteriormente, outros pesquisadores foram desvendando mais detalhes dos complexos proteicos envolvidos no mecanismo de RNAi.

Vários estudos comprovaram que RNAi desencadeado por duplexes de RNA é um mecanismo conservado em diferentes eucariotos, desde organismos unicelulares como *Paramecium*, aos pluricelulares como protozoários, vermes e mamíferos (e.g., Churikov et al., 2000; Yao et al., 2003; Morris et al., 2004). Esses trabalhos sugerem o enorme potencial do uso de RNAi como uma ferramenta para o silenciamento de genes, contribuindo para estudos de genômica funcional visando a determinação de funções gênicas, geração de organismos com características alteradas conforme nosso interesse, e desenvolvimento de terapias para prevenção e cura de doenças degenerativas e infecciosas em animais, humanos e plantas. Devido à importância da descoberta e perspectivas da tecnologia, Fire e Mello receberam o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 2006, e a revista *Economist* descreveu os pequenos RNAs como o “Big Bang da Biologia”.

Atualmente, a tecnologia de RNAi vem sendo muito utilizada em diferentes áreas da agricultura, mas muito ainda precisa ser realizado para o seu uso no manejo de doenças de plantas em campo (Rosa et al., 2018). Pelo nosso conhecimento, nenhum produto protetor à base de duplex de RNA encontra-se disponível comercialmente para o controle de fitopatógenos. No entanto, plantas transgênicas com resistência a doenças, que têm como base o mecanismo de RNAi, já são comercialmente disponíveis desde o final do século XX. Um caso de sucesso é o mamoeiro transgênico resistente à infecção pelo vírus do anel do mamoeiro (*Papaya ringspot virus*, PRSV), causador da mancha anelar, e que foi liberado comercialmente no Havaí, EUA, em 1998 (Gonsalves, 2002; 2006). A planta transgênica foi modificada para expressar uma sequência parcial do gene do capsídeo do PRSV, seguindo o conceito de PDR, sendo posteriormente confirmado que a resistência era mediada pelo mecanismo de PTGS (Kung et al., 2015). Mais recentemente, uma planta de milho geneticamente modificada de acordo com a tecnologia de RNAi para o controle da vaquinha (*Diabrotica virgifera*) foi liberada para comercialização no Canadá e Brasil em 2016, e nos Estados Unidos em 2017. No Brasil, foi desenvolvido um feijão transgênico modificado com a introdução de parte do genoma

do vírus do mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus*, BGMV), um patógeno altamente agressivo (Aragão et al., 2013). A planta é imune à infecção pelo BGMV.

Esses eventos de liberação comercial foram um marco para a agricultura, uma vez que o RNAi, antes tão distante de ser aplicado em campo, agora está disponível aos produtores como uma ferramenta para o manejo de doenças e pragas. Contudo, o desenvolvimento e sucesso na utilização desta tecnologia em plantas transgênicas são limitados por diversos fatores, entre os quais se destacam: (i) características intrínsecas de cada planta que dificultam sua transformação genética; (ii) fatores políticos; e (iii) a falta de confiança do consumidor em relação aos produtos transgênicos (Popek & Halagarda, 2017; Zotti et al., 2018). Por isso, a entrega tópica de duplexes de RNA vem sendo amplamente estudada e explorada como uma ferramenta alternativa para proteção de plantas.

O primeiro trabalho de sucesso usando moléculas de RNA aplicadas topicamente em plantas foi realizado para controle dos vírus das espécies *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Tobacco etch virus* (TEV) e *Alfalfa mosaic virus* (AMV) em *Nicotiana benthamiana*, tabaco e pimenta (*Capsicum chinense*) (Tenllado & Diaz-Ruiz, 2001). Duas décadas após o trabalho de Tenllado & Diaz-Ruiz (2001), muitos estudos vêm sendo realizados para aprimorar o conhecimento da rota biológica dos duplexes de RNA exógenos, metodologias de aplicação e viabilização da produção, conforme será apresentado adiante neste capítulo.

### 3. Via de silenciamento mediada por moléculas de RNA exógenas em plantas

O mecanismo de RNAi está envolvido em diversas rotas biológicas responsáveis pela estabilidade genética, regulação epigenética, desenvolvimento, reprodução e defesa das plantas (Wang & Chekanova, 2016). Como mencionado anteriormente, as vias de RNAi são desencadeadas pela presença de duplexes de RNA, isto é, moléculas de RNA de fita dupla que são reconhecidas e processadas em pequenos RNAs (*small RNA*, sRNA) pela maquinaria da célula eucariótica (Borges & Martienssen, 2015). Estes duplexes de RNA podem ser gerados como um intermediário durante a replicação viral, pela hibridização de RNAs endógenos complementares presentes no genoma da planta, por uma construção gênica desenhada em orientações invertidas ou pelo emparelhamento de uma fita simples de RNA contendo sequências complementares nas extremidades com um espaçador no meio, resultando na formação de uma estrutura em forma de grampo (*hairpin RNA*, hpRNA) (Parent et al., 2012).

Em plantas, há duas categorias principais de sRNAs: micro RNA (miRNA) e pequeno RNA interferente (*small interfering RNA*, siRNA). Estas moléculas diferem entre si em alguns aspectos, como a biogênese, o modo de regulação gênica e as funções biológicas em que estão envolvidas. Contudo, apesar das diferenças, são bioquimicamente próximas e suas vias são interconectadas e/ou sobrepostas (Ghildiyal & Zamore, 2009; Guleria et al., 2011; Axtell, 2013).

Na via de RNAi induzida pela aplicação tópica de RNA, na qual estão envolvidos os siRNAs, ocorre uma cascata de respostas que é igualmente ativada quando as plantas detectam moléculas de ácido nucleico invasores. Múltiplos componentes estão envolvidos nesta rota de silenciamento em plantas, entre eles pode-se destacar as proteínas *Dicer-Like* (DCL, nomeadas como DCL1 a DCL4), o complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-Induced Silencing Complex*, RISC), as proteínas Argonautas (AGO) e as enzimas RNA polimerases dependentes de RNA (*RNA-Dependent RNA Polymerase*, RDR) (Jacobsen et al., 1999; Dalmay et al., 2000; Schauer et al., 2002; Liu et al., 2004; Baumberger & Baulcombe, 2005).

DCL é uma ribonuclease (RNase III) que foi observada pela primeira vez com atividade endonucleolítica de RNAs em *Escherichia coli* (Robertson et al., 1968). Trata-se de uma proteína da família de endoribonuclease que contém na sua estrutura os domínios *Piwi-Argonaute-Zwille* (PAZ), *DExD-box Helicase-C*, RNase III e um com afinidade de ligação a moléculas de dupla fita de RNA (*dsRNA-binding domain*, dsRBDs) (Carmell & Hannon, 2004; Margis et al., 2006).

Uma vez reconhecidos e em contato com uma DCL, os duplexes de RNA são processados em siRNAs com tamanho entre 21 a 24 pares de bases (pb) (Carmell & Hannon, 2004). O comprimento da sequência dos siRNAs é determinado pela DCL que os clivou, e diferentes funções são assumidas de acordo com o tamanho dos siRNAs. Por exemplo, DCL4 processa siRNAs de 21 pb, DCL2 de 22 pb e DCL3 de 24 pb de comprimento (Hohn & Vazquez, 2011). As moléculas de siRNA são então associadas a proteínas AGO. Estas proteínas pertencem a uma família multigênica, compostas por três domínios conservados: PAZ, *Middle* (MID) e *P-element induced wimpy* (PIWI). O domínio PAZ reconhece a extremidade 3' do siRNA, enquanto os domínios MID e PIWI ancoram a extremidade 5' do siRNA.

As proteínas AGO, por si só, não conseguem acoplar completamente os siRNAs a sua estrutura. Para que isso ocorra, é necessário a presença do RISC (Pham et al., 2004; Kawamata & Tomari, 2010). Essa associação resulta na ocorrência de várias etapas que culminam na alteração da estrutura do siRNA para que o RISC esteja completamente maduro e funcional (Kobayashi & Tomari, 2016).

Após a incorporação do siRNA ao complexo RISC, a AGO, que contém um domínio catalítico de RNase, cliva uma das fitas do siRNA, e a que permanece recebe o nome de fita guia. Qualquer uma das fitas do siRNA pode ser utilizada como fita guia, e, em geral, a escolha da fita que permanece no complexo RISC está associada à cadeia que apresenta menor estabilidade termodinâmica na extremidade 5' (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Após o acoplamento da fita guia, o RISC é considerado funcional, sendo a fita capaz de guiar o silenciamento de RNAs homólogos (Kawamata & Tomari, 2010; Ketting, 2011; Kwak & Tomari, 2012). O silenciamento ocorre pela clivagem e degradação sequência-específica do mRNA ou inibição da sua tradução na região citoplasmática (Song et al., 2004; Wang et al., 2009; Parker, 2010; Borges & Martienssen, 2015). O processo de PTGS não ocorre apenas em nível celular, uma vez que as moléculas de RNA podem se translocar célula-a-célula ou sistemicamente na planta.

## 4. Translocação célula-a-célula e sistêmica de RNAs em plantas

Em plantas, assim como em alguns animais, diferentes moléculas de RNA funcionam como sinais móveis da via de RNAi, que são translocadas por curtas ou longas distâncias, levando ao silenciamento de RNA com sequências homólogas em uma área limitada ou em toda a planta, respectivamente (Mermigka et al., 2016). Dessa forma, após ser iniciado em células de um tecido específico, o processo de interferência pode ser expandido para outras células de tecidos adjacentes e resultar em RNAi sistêmico (Melnik et al., 2011; Mermigka et al., 2016).

Um dos trabalhos pioneiros na demonstração da natureza móvel do silenciamento por RNA foi realizado em plantas transgênicas expressando o gene da proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP) (Voinnet & Baulcombe, 1997). Folhas de *N. benthamiana* foram infiltradas com *Agrobacterium tumefaciens* contendo uma construção com o gene GFP e, após 18 dias, observou-se que a expressão do transgene foi silenciada nas folhas de brotos axilares e superiores da planta. Os autores sugeriram que esta interferência seria causada por uma molécula-sinal transportada para fora da folha infiltrada, provavelmente um fragmento de ácido nucleico (Voinnet & Baulcombe, 1997). No mesmo ano, Palauqui & colaboradores (1997) demonstraram, por meio de experimentos de enxertia em tabaco, que o sinal do silenciamento podia ser eficientemente transmitido de um porta-enxerto com um transgene silenciado para o enxerto que expressava o transgene correspondente, resultando no silenciamento do transgene no enxerto. Hoje, sabe-se que pequenas moléculas de RNA, como siRNAs, são predominantemente responsáveis pela distribuição do sinal de RNAi, sendo transportadas a curta distância (movimento célula-a-célula) por meio de canais denominados como plasmodesmata (PD), e a longa distância (movimento sistêmico) através do floema (Dunoyer et al., 2010; Melnik et al., 2011; Mermigka et al., 2016; Wang & Dean, 2020).

PD interconecta a maioria das células vegetais, gerando um contínuo citoplasmático que permite o tráfego de moléculas dentro das plantas (Kitagawa & Jackson, 2017). Existem vários estudos sobre o transporte celular via PD, incluindo o envolvimento de proteínas que podem se associar ao PD para alterar a sua condutividade em função de estresses abióticos e bióticos (Heinlein & Epel, 2004; Lee et al., 2005; Fernandez-Calvino et al., 2011; Kitagawa & Jackson, 2017), porém, o conhecimento sobre o mecanismo do movimento intercelular de sRNAs via PD ainda é limitado. Somente recentemente uma quinase receptora, a *Barely Any Meristem-1* (BAM1), foi identificada em PD e associada à disseminação de RNAi, assim como sua enzima homóloga, a BAM2, que também desempenha papel redundante na sinalização célula-a-célula (Rosas-Diaz et al., 2018).

Com relação ao transporte sistêmico, diferentes classes de RNA – como siRNA, miRNA, RNA ribossomal, RNA transportador e RNA mensageiro – têm sido encontradas em amostras de floema (Kehr & Kragler, 2018), mas pouco se sabe como a translocação destas moléculas ocorre especificamente. É possível que o acesso de RNA ao floema seja seletivo (Maizel et al., 2020) e envolva fatores que facilitam a sua

transferência, como sequências específicas padronizadas conhecidas como *motifs* (Ding et al., 2005; Kehr & Kragler, 2018). Contudo, apesar de alguns trabalhos terem associado a presença de *motifs* de RNA com o seu transporte nas células vegetais (Ham et al., 2009; Zhang et al., 2016), nem todos os RNAs que translocam parecem contê-los (Kehr & Kragler, 2018).

O transporte à longa distância de grandes duplexes de RNA aplicados topicamente em plantas ainda é controverso, embora existam publicações envolvendo essa movimentação sistêmica de RNAs derivados de vírus (Konakalla et al., 2016; Gogoi et al., 2017; Kaldis et al., 2018; Namgial et al., 2019) e fungo (Koch et al., 2016). Em estudo com dsRNA de 666 pb homólogo ao gene *p126* (supressor de silenciamento) de *Tobacco mosaic virus* (TMV), Konakalla & colaboradores (2016) sugeriram que o dsRNA utilizado poderia conter *motifs* que interagiram com proteínas celulares vegetais e facilitaram seu transporte sistêmico em tabaco. Em contrapartida, dsRNAs complementares a sequências de outros fitovírus ficaram restritos ao local de aplicação na planta e não translocaram sistemicamente (Tenllado & Díaz-Ruiz, 2001; Rêgo-Machado et al., 2020). Logo, mais estudos são necessários para elucidar o movimento sistêmico de duplexes de RNA longos, especialmente sobre interações entre possíveis *motifs* de RNA, se houverem, e proteínas vegetais (Konakalla et al., 2016), a fim de esclarecer os resultados contraditórios sobre o transporte destas moléculas.

É importante destacar que, em plantas, nematoides e fungos, siRNAs secundários têm papel essencial na amplificação, transitividade e disseminação do silenciamento (Vazquez & Hohn, 2013). Para tanto, siRNAs primários – oriundos da clivagem dos duplexes de RNA primários que ativam a via de RNAi – iniciam a síntese de moléculas de dsRNA a partir do mRNA alvo pela ação de enzimas RDR. Estas novas moléculas são, então, clivadas em siRNAs secundárias por enzimas DCL (Voinnet, 2008; Vazquez & Hohn, 2013). O efeito do tamanho de siRNAs sobre a ocorrência de RNAi local e sistêmico em plantas transgênicas de *N. benthamiana* expressando GFP foi estudado e os autores constataram que a aplicação por pulverização de siRNAs de 21, 22 e 24 pb complementares ao GFP silenciou localmente a fluorescência verde, enquanto o silenciamento sistêmico foi observado após aplicação de siRNAs de 22 pb (Dalakouras et al., 2016). Acredita-se, portanto, que siRNAs de 22 pb são os principais indutores de RNAi sistêmico nas plantas, provavelmente devido à sua capacidade de recrutar uma RDR para o seu mRNA alvo e levar à biogênese de siRNAs secundários (Dalakouras et al., 2020). Esta amplificação do silenciamento por RDR é importante na defesa efetiva de plantas contra patógenos (Wang et al., 2010; Song et al., 2018a).

Uma potencial alternativa ao transporte de RNA entre células e via floema é através de vesículas extracelulares (*Extracellular Vesicles*, VE) (Kehr & Kragler, 2018), uma vez que diversos tipos de sRNA foram identificados em VE de plantas de *Arabidopsis* (Baldrich et al., 2019). Segundo Wang & Dean (2020), estes sRNAs podem ser translocados intercelularmente (através de PD) e entre organismos filogeneticamente diferentes dentro de VE. Como exemplo, foi reportada a secreção de VE do tipo exossomo em plantas de *Arabidopsis* para entrega de RNAs ao patógeno *Botrytis cinerea*. As vesículas se acumularam nos tecidos infecciosos da planta e foram, então, absorvidas pelas células fúngicas, resultando na indução do silenciamento de genes relacionados à patogenicidade do fungo (Cai et al., 2018).

Existe também relato do transporte de siRNA e hpRNA através do xilema de macieiras, videiras e *N. benthamiana* (Dalakouras et al., 2018). A aplicação tópica destas moléculas por meio de injeções no tronco e absorção por pecíolos das plantas restringiu sua translocação ao xilema e apoplasto. Porém, após a entrega de hpRNA, não foram detectados siRNAs, sugerindo que o transporte pelo xilema não leva o RNA fornecido exogenamente para o interior das células onde ocorre o processamento por enzimas DCL e, conseqüentemente, não desencadeia o RNAi na planta (Dalakouras et al., 2018). Portanto, o floema deve ser, de fato, a via mais importante de RNAi sistêmico para controle de fitopatógenos.

## 5. Seleção do alvo e produção de duplexes de RNA

A estratégia de aplicação tópica de duplexes de RNA para o manejo de fitopatógenos possui três pontos críticos que devem ser levados em consideração a fim de minimizar os impactos no ecossistema e controlar eficientemente o patógeno-alvo: (i) identificação do gene-alvo adequado; (ii) produção de RNA em larga escala e com baixo custo para uso em campo; e (iii) desenvolvimento de uma metodologia de entrega das moléculas adequada ao patógeno-alvo (Kaur et al., 2016).

Inicialmente, deve-se fazer um estudo criterioso na busca de genes candidatos a serem silenciados no fitopatógeno, de forma que o dsRNA desenvolvido não encontre alvos em plantas cultivadas ou organismos benéficos (efeito fora do alvo ou *off-target*). No geral, os genes devem estar envolvidos em processos biológicos essenciais ao patógeno, de modo que, ao serem silenciados, gerem um fenótipo preferencialmente letal. Genes ligados ao crescimento, movimento, reprodução ou sobrevivência são frequentemente selecionados (Dubrovina & Kiselev, 2019). Alguns exemplos estão listados na Tabela 1.

Adicionalmente, a escolha da região gênica com homologia ao duplex de RNA também é determinante para a especificidade ao alvo. Moléculas de amplo espectro requerem que o desenho do dsRNA ocorra em regiões conservadas do gene, como os *motifs*; enquanto o controle espécie-específico baseia-se em regiões variáveis que diferem em nível de espécie ou mesmo entre indivíduos de uma mesma população (Gatta et al., 2018). Dessa maneira, é possível ajustar a especificidade do silenciamento ao nível taxonômico desejado, sendo também necessário investigar todo o contexto ambiental (genoma da planta hospedeira e de organismos benéficos associados) para garantir a ausência de efeito *off-target* (Mogren et al., 2017). A escolha de um gene e/ou uma região genômica eficaz e com um alto nível de silenciamento resultará na morte ou interrupção do ciclo de vida apenas do(s) patógeno(s)-alvo(s).

Atualmente, três tipos de duplexes de RNA vêm sendo utilizados com sucesso em estudos de indução tópica de RNAi para o controle de fitopatógenos: dsRNA, hpRNA e siRNA (Tabela 1) (Dubrovina & Kiselev, 2019). Os dsRNA e hpRNA variam entre 300-800 pb de comprimento (Watson et al., 2005). Além do tamanho, dsRNA e hpRNA são funcionalmente semelhantes, mas diferem em suas estruturas. Enquanto hpRNA é formado por uma única sequência de RNA contendo uma região espaçadora que

mantém as fitas senso e antisenso fisicamente unidas, dsRNA é composto por duas fitas complementares independentes (Watson et al., 2005). Embora estas moléculas mais longas e complexas sejam muito utilizadas e apresentem maior eficiência em induzir o silenciamento gênico (Zhang, 2014), elas podem ter algumas limitações. Por exemplo, duplexes de RNA muito grandes, após serem processados por DCL, dão origem a inúmeros e variados fragmentos de siRNA, aumentando as chances destes pequenos RNAs terem identidade com outros genes e, dessa forma, causarem efeito *off-target* (Jackson et al., 2003; Bartoszewski & Sikorski, 2019). Além disso, o uso de longas fitas de dsRNA torna desafiador o silenciamento de uma sequência específica dentro de uma família gênica, devido ao alto grau de similaridade das sequências (Zhang, 2014).

Os siRNAs são moléculas que apresentam fita dupla e variam de 21 a 24 pb de comprimento, contendo dois nucleotídeos livres na extremidade 3' e um grupo fosfato na extremidade 5' (Watts et al., 2008; Dong et al., 2019). A comprovação de que siRNAs são capazes de induzir o silenciamento gênico foi realizada pela primeira vez por Elbashir & colaboradores (2001) em células de drosófila no começo do século XXI. Hoje, sabe-se que um grupo de siRNAs é capaz de silenciar um único alvo, mas podem apresentar diferenças na efetividade do silenciamento (Holen et al., 2002).

Além da seleção do alvo, outro gargalo no uso de RNAi é a produção dos duplexes de RNA em larga escala para a viabilidade econômica da estratégia de aplicação tópica em campo. A quantidade, integridade e pureza dos dsRNAs estão entre os principais requisitos para o sucesso da tecnologia. Assim, a otimização dos processos de produção e purificação em larga escala é necessária. As moléculas de dsRNA, hpRNA e siRNA podem ser produzidas quimicamente, biologicamente e *in vitro* (Micura, 2002; Sohail et al., 2003; Dubrovina & Kiselev, 2019), sendo as três sínteses amplamente utilizadas, cada uma apresentando suas particularidades.

No processo de triagem de um alvo, quando uma pequena quantidade de dsRNA, hpRNA ou siRNA é necessária para os testes, é comum que a síntese ocorra utilizando kits comerciais, onde a transcrição do RNA é realizada a partir de uma fita molde de DNA por meio de uma RNA polimerase dependente de DNA (Niehl et al., 2018). Esses kits são caros, laboriosos e permitem a produção de uma limitada quantidade de moléculas de dsRNA de forma pura, rápida e confiável.

A síntese química é capaz de produzir os duplexes de RNA em larga escala por um processo livre de clonagem em células eucariontes ou procariontes, ou seja, um processo muito semelhante à transcrição *in vitro*. As construções que darão origem aos duplexes de RNA devem ser clonadas em vetores comerciais que permitem a sua multiplicação por meio da polimerização de nucleotídeos. Essa transcrição pode ser realizada em biorreatores contendo a enzima RNA polimerase dependente de DNA e outros componentes. A principal limitação para esta metodologia é o alto custo de produção. Por exemplo, atualmente, a empresa AgroRNA oferece 100 gramas de dsRNA por US\$ 4.500 ([http://www.agroRNA.com/sub\\_05.html](http://www.agroRNA.com/sub_05.html)). O ponto positivo do processo de produção química é a geração de moléculas de dsRNA livres de qualquer contaminação com outros ácidos nucleicos ou proteínas. A síntese química consiste na principal forma de produção de siRNAs (Palli, 2014). Além disso, modificações químicas na estrutura das moléculas de RNA, objetivando aumentar a sua estabilidade,

podem ser rapidamente introduzidas, embora não sejam prontamente realizadas em laboratório e apresentem um custo elevado, o que inviabiliza a aplicação em campo (Braasch et al., 2003).

Já a produção de dsRNA e hpRNA por células procariontes é uma estratégia sustentável e capaz de gerar um grande volume de moléculas por baixo custo (Huang et al., 2013). A síntese biológica de duplexes de RNA pode ocorrer em leveduras ou bactérias deficientes na expressão de RNase III, enzima capaz de clivar moléculas dupla fita de RNA (Huang et al., 2013). A estirpe bacteriana mais frequentemente usada é a L1440-HT115 (DE3) engenheirada para a expressão da enzima T7 RNA polimerase visando a síntese de duplexes de RNA a partir de um plasmídeo (Arhancet et al., 2013, 2014; Huang et al., 2013). Nesse caso, a bactéria é cultivada em meio de cultura e, após sua multiplicação e indução da expressão da T7 polimerase, as células bacterianas são concentradas e lisadas (Tenllado et al., 2003; Vatanparast & Kim, 2017). Opcionalmente, as bactérias podem ter o RNA total extraído e purificado para obtenção dos dsRNAs. Bactérias ou duplexes de RNA purificados são aplicados diretamente nas plantas. Trata-se da síntese mais barata e interessante para produção de dsRNA em grande concentração, porém, apresenta uma menor pureza e maior tempo despendido na produção e clonagem dos alvos.

Uma estratégia mais elaborada consiste na transfecção da bactéria simultaneamente com dois plasmídeos, um para a expressão do dsRNA e outro para a expressão e tradução de uma proteína capsidial de um bacteriófago (Aalto et al., 2007; Hone, 2009). O dsRNA a ser expresso obrigatoriamente deve conter um domínio conservado que permita a interação entre o dsRNA com a proteína capsidial, possibilitando, assim, a sua encapsidação (i.e., encapsulamento). A encapsidação das moléculas de dsRNA garante maior estabilidade e possibilita seu uso para os mais diversos fins. Contudo, em se tratando de moléculas para aplicações agrícolas, algumas restrições referentes a essa abordagem têm sido reportadas, como por exemplo, a pulverização de plantas com partículas semelhantes a fitovírus pode possibilitar a heteroencapsidação de outros vírus fitopatogênicos que estão no ecossistema. No mesmo sentido, a aplicação de uma proteína exógena pode caracterizar uma tecnologia similar a transgênicos ou que tenha efeitos potenciais semelhantes, com restrições de uso e probabilidade de efeitos alergênicos aos seres humanos ou a outros seres vivos que compõem a cadeia alimentar. O ponto favorável desta metodologia é a facilidade de otimização do processo de produção e purificação em larga escala que permite menor perda de dsRNA por degradação.

Um outro método de produção de dsRNA que tem sido eficaz para o silenciamento gênico envolve a seleção de bactérias simbiotes capazes de colonizar e reproduzir no organismo alvo e, posteriormente, a transformação desse simbiote para expressar a molécula de RNA de interesse (Keates et al., 2008; Xiang et al., 2009). A aplicação das células vivas tem como vantagem a duração e o efeito do silenciamento, além da redução de pulverizações e do custo para implementação da tecnologia em campo (Goodfellow et al., 2019). Essas bactérias apresentam rápido crescimento em meio de cultura e, além disso, estão adaptadas às condições ambientais e ao hospedeiro eucariótico, e observa-se um menor nível da degradação das moléculas de duplex de RNA (Liu et al., 2017). Em contrapartida, por envolver a geração de um organismo geneticamente modificado, a sua liberação no ambiente exige a aprovação pelas agências regulatórias

governamentais (no caso do Brasil, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança), processo que pode requerer alguns anos entre a solicitação e aprovação, além de elevar o custo da tecnologia. Embora não esteja claro como bactérias translocam RNAs exógenos para organismos eucariotos, acredita-se que isso ocorra por meio de vesículas, que podem carrear diversas moléculas, como outros RNAs. Dessa forma, a interação ocorre por meio da endocitose ou fusão das vesículas com a membrana receptora. Uma vez em contato com a membrana receptora, o conteúdo contido na vesícula é liberado no citoplasma eucarioto. Portanto, as bactérias não apenas produzem os dsRNAs como também facilitam a entrega dos dsRNA *in loco* (Ghosal et al., 2015).

## 6. Métodos de aplicação tópica de RNAs e formulações

Independente do duplex de RNA e de como ele foi sintetizado, a obtenção de bons resultados no silenciamento varia de acordo com o método de entrega da molécula selecionada. A escolha correta do sistema de entrega pode agilizar todo o processo e economizar anos de desenvolvimento e comercialização (Andrade & Hunter, 2016). Na Tabela 1 estão resumidos os métodos de aplicação tópica de duplexes de RNA que vêm sendo utilizados para o controle de fitopatógenos em diferentes espécies vegetais.

O silenciamento gênico induzido por spray (*Spray-Induced Gene Silencing*, SIGS) é considerado a estratégia mais promissora para a proteção de culturas (Morozov et al., 2019), pois pode ser facilmente implementado em campo. Além disso, SIGS tem sido bastante explorado devido ao seu potencial para controlar diversos patógenos que infectam a parte aérea de plantas. Como exemplo, a pulverização de RNA total contendo siRNA e dsRNA direcionados aos genes *DCL1* e *DCL2* de *B. cinerea* – envolvidos na produção de efetores de RNA que silenciam os genes de imunidade da hospedeira – inibiu significativamente o desenvolvimento do fungo em frutos (tomate, morango e uva), vegetais (alface e cebola) e pétalas de rosas (Wang et al., 2016). Em cevada, a aplicação foliar de dsRNAs homólogos a genes relacionados a biossíntese de ergosterol de *Fusarium graminearum* resultou na inibição do crescimento fúngico tanto em folhas pulverizadas diretamente, quanto em folhas distais não pulverizadas (Koch et al., 2016). A eficiência de SIGS também é relatada para o controle de fitovírus, como TMV, *Tomato mosaic virus* (ToMV) e *Bean common mosaic virus* (BCMV) (Niehl et al., 2018; Worrall et al., 2019; Rêgo-Machado et al., 2020). Adicionalmente, os resultados satisfatórios com a aplicação mecânica de dsRNAs em folhas de diferentes plantas (Tabela 1) têm aumentado a perspectiva da pulverização foliar como uma potente ferramenta para o manejo de vírus em campo (Tenllado & Díaz-Ruiz, 2001; Rêgo-Machado et al., 2020).

O silenciamento gênico induzido por vírus (*Virus-Induced Gene Silencing*, VIGS) é outro método promissor para entrega de duplexes de RNA às plantas (Cagliari et al., 2019). Nesse caso, uma espécie de vírus selecionada é modificada molecularmente para carregar o fragmento de RNA do gene-alvo, tornando-se um vetor viral recombinante. Depois de ser inoculado, este vetor inicia sua replicação ativando o RNAi na

planta por meio da produção contínua de dsRNA à medida que segue seu ciclo replicativo no hospedeiro (Wani et al., 2010). Porém, o tipo de vírus utilizado e a sua engenharia podem interferir na eficácia e estabilidade do silenciamento (Senthil-Kumar & Mysore, 2011). Alguns exemplos de vetores virais são: TMV, *Tobacco rattle virus* (TRV), *Potato virus X* (PVX) e *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Senthil-Kumar & Mysore, 2011). Esta estratégia tem sido usada em diferentes espécies vegetais para estudar genes envolvidos em resistência a fungo (van der Linde et al., 2011), nematoide (Mao et al., 2011) e inseto (Mantelin et al., 2011).

Segundo Nandety e colaboradores (2015), VIGS baseado em vírus de plantas é uma ferramenta eficaz para atingir pragas que se alimentam do floema, pois quase todos os fitovírus infectam e se movem sistemicamente via floema. *Diaphorina citri*, por exemplo, inseto sugador de seiva e transmissor das bactérias causadoras do *huanglongbing* dos citros (também conhecido como *greening*), foi afetado pelo uso de um vetor de *Citrus tristeza virus* (CTV) recombinante contendo uma sequência de RNA do gene *abnormal wing disc* (*Awd*) do psilídeo. A alimentação das ninfas em plantas infectadas com CTV recombinante resultou no silenciamento do gene-alvo, *Awd*, levando à má formação das asas e aumento de mortalidade dos insetos adultos (Hajeri et al., 2014). Outros estudos mostram a eficiência de VIGS para controlar diferentes pragas agrícolas (Kumar et al., 2012; Wuriyanghan & Falk, 2013; Taning et al., 2018), confirmando o potencial deste método que pode ser expandido para o manejo de fitopatógenos habitantes do floema. Além dos vírus, a entrega de duplexes de RNA expressos em bactérias também já foi investigada, com obtenção de resultados positivos para a proteção de culturas (Yin et al., 2009; Gan et al., 2010; Shen et al., 2014).

Estratégias adicionais envolvendo a aplicação tópica de RNAs em plantas têm sido testadas para controle de insetos-praga, como a entrega de dsRNA por sistemas radiculares e troncos. A irrigação das raízes de arroz e milho com soluções de dsRNAs direcionados a genes de duas pragas agrícolas, *Nilaparvata lugens* e *Ostrinia furnacalis*, aumentou a taxa de mortalidade dos insetos após alimentação nas plantas tratadas (Li et al., 2015a). De forma semelhante, moléculas de dsRNA foram eficientemente aplicadas em árvores cítricas e videiras via irrigação das raízes e injeções nos troncos, reduzindo a sobrevivência de psilídeos e cigarrinhas (Hunter et al., 2012). Ghosh e colaboradores (2017) observaram que a expressão dos genes *juvenile hormone acid O-methyltransferase* (*JHAMT*) e *vitellogenin* (*Vg*) reduziram significativamente quando ninfas do percevejo marmorado marrom (*Halyomorpha halys*) se alimentaram de feijões verdes imersos em uma solução contendo dsRNAs homólogos a estes dois genes-alvos.

O método de infiltração direta de moléculas de dsRNA em planta usando seringa sem agulha foi utilizado para silenciamento de genes em *Arabidopsis thaliana* (Numata et al., 2014). Este e os demais métodos mencionados anteriormente visando o controle de pragas podem ser adaptados para outros modelos de estudo, incluindo fitopatógenos que colonizam raízes e sistemas vasculares. Contudo, o sucesso de qualquer estratégia para indução tópica de RNAi depende da entrada eficiente e transporte sistêmico dos duplexes de RNA, garantindo a proteção da planta inteira contra o patógeno. Além disso, a estabilidade das moléculas também interfere na eficácia do silenciamento e durabilidade da proteção. De acordo com Goodfellow et al. (2019), seja no interior da planta ou apenas depositados sobre ela, os RNAs podem ser degradados por meio fí-

sicos e biológicos e, conseqüentemente, perder a capacidade de protegê-la. Para resolver esse problema, alguns trabalhos foram desenvolvidos com compostos ou materiais aditivos que aumentam a estabilidade ou facilitam a adesão aos tecidos vegetais e penetração das moléculas, como oligopeptídeos catiônicos (Unnamalai et al., 2004), nanopartículas de fluorescência catiônica (Jiang et al., 2014), peptídeos carreadores (Numata et al., 2014) e nanoestruturas de DNA (Zhang et al., 2019).

Formulações de RNAs com nanopartículas estão sendo amplamente investigadas. As nanopartículas são materiais promissores para entrega de biomoléculas em plantas devido a sua capacidade de atravessar a parede celular vegetal sem força externa (entrada passiva) e por possuírem propriedades físico-químicas ajustáveis, possibilitando sua aplicabilidade em uma ampla gama de hospedeiras (Cunningham et al., 2018). Um trabalho recente mostrou que nanopartículas de argila com dupla camada de hidróxido (*Layered Double Hydroxide*, LDH) como carreadores de dsRNA protegeram as moléculas da degradação por nucleases, proporcionaram estabilidade prolongada e promoveram uma liberação lenta do dsRNA na superfície da planta; tecnologia que foi denominada como BioClay (Mitter et al., 2017a). A entrega de dsRNA em BioClay por pulverização estendeu a proteção viral de 5 dias para pelo menos 20 dias utilizando PMMoV e CMV como vírus modelos em plantas de tabaco (Mitter et al., 2017a; 2017b), e o dsRNA foi detectado na superfície de folhas tratadas mesmo 30 dias após a aplicação (Mitter et al., 2017a). É importante destacar que o LDH é biocompatível e se degrada com segurança na presença de condições levemente ácidas, minimizando o risco de persistência excessiva do dsRNA no ambiente (Fletcher et al., 2020).

Uma outra classe de nanopartículas, chamadas de pontos quânticos de carbono (*Carbon Quantum Dots*, CQD) ou nanopartículas de carbono, foi utilizada para entregar moléculas de siRNA em linhagens de tomate e *N. benthamiana* expressando GFP. A pulverização de siRNAs formulados com CQD e um surfactante de propagação resultou no silenciamento dos transgenes de GFP em ambas as espécies. A eficiência da formulação foi igualmente demonstrada para genes endógenos de *N. benthamiana* relacionados à síntese de clorofila, com o fenótipo de branqueamento das folhas indicando a redução no acúmulo do pigmento (Schwartz et al., 2020). Em estudos direcionados a pragas agrícolas, relatou-se uma maior estabilidade das moléculas de RNA associadas a nanopartículas de carbono e conseqüente aumento na eficácia do silenciamento (Edwards et al., 2020; Kaur et al., 2020).

A entrega de dsRNA através de lipossomos também tem sido explorada. Lipossomos são vesículas nanométricas esféricas constituídas principalmente por fosfolipídeos, onde uma fase aquosa é totalmente cercada por uma ou mais bicamadas lipídicas. Estas vesículas podem englobar ácidos nucleicos ou princípios ativos e os liberar nos sítios de ação sem danificá-los (Edwards & Baeumner, 2006). Por serem biodegradáveis e biocompatíveis, os lipossomos são altamente versáteis para pesquisas. Como exemplo, a encapsulação de dsRNAs em lipossomos melhorou a estabilidade das moléculas e sua captação em insetos (Whyard et al., 2009; Lin et al., 2017). Em *Euschistus heros*, uma importante praga da soja, os complexos de lipossomos aumentaram a mortalidade das ninfas que se alimentaram das formulações em comparação com o dsRNA puro (Castellanos et al., 2019).

É evidente que as formulações de duplexes de RNA com compostos ou materiais estabilizadores, como os lipossomos e nanopartículas mencionados aqui, podem ser facilmente expandidas para o controle de fitopatógenos. Sem dúvida, essas biotecnologias são importantes para garantir a integridade das moléculas, penetração nos tecidos vegetais, longevidade da resistência induzida e, principalmente, para viabilizar a estratégia de uso tópico em campo.

## 7. Controle de fitopatógenos por indução tópica de RNAi

Exemplos de estudos bem sucedidos envolvendo a indução tópica de RNAi para controle de patógenos vegetais estão listados na Tabela 1. Os fungos, com raras exceções, contêm os principais componentes das vias de silenciamento (DCL, AGO e RDR) e, portanto, possuem mecanismos ativos de RNAi (Dang et al., 2011). O uso tópico de duplexes de RNA interfere na infecção fúngica de diferentes maneiras, tais como: inibição do crescimento, redução da patogenicidade, alteração na morfologia ou resultando em sintomas mais leves da doença (Dubrovina & Kiselev, 2019). Atualmente, a estratégia de SIGS é considerada potente e promissora para proteção de plantas contra fungos (Wang & Jin, 2017). Após a aplicação, as moléculas de RNA na superfície das plantas podem seguir duas possíveis vias: (i) dsRNA/siRNA externos são primeiro internalizados nas células vegetais e, posteriormente, transferidos para células fúngicas, sendo que os dsRNAs são processados em siRNAs tanto por enzimas DCL da planta quanto DCLs do patógeno; e (ii) dsRNA/siRNA externos são diretamente absorvidos pelas células fúngicas, e os dsRNAs são clivados em siRNAs somente por enzimas DCL do patógeno (Koch et al., 2016; Wang et al., 2016; Wang & Jin, 2017; Song et al., 2018a). É possível, ainda, que as duas vias ocorram simultaneamente (Wang & Jin, 2017).

A aplicação tópica de duplexes de RNA demonstrou ser eficiente para o controle de diferentes espécies fúngicas (Tabela 1). Além do silenciamento de genes essenciais aos fungos, os RNAs também são utilizados para interferir na resistência dos patógenos a fungicidas. Moléculas de dsRNA direcionadas a regiões do gene *Myosin5* de *F. asiaticum*, por exemplo, reduziram a resistência ao fenamacril tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Após a pulverização de dsRNA mais o fungicida em plantas de trigo, observou-se o controle mais eficiente da infecção de uma estirpe do fungo resistente a fenamacril (Song et al., 2018b). De forma semelhante, o dsRNA derivado de outro gene de *F. asiaticum* ( *$\beta$ 2-tubulin*) aumentou a sensibilidade do fungo a carbendazim, podendo ser usado como um agente redutor da resistência a este fungicida (Gu et al., 2019).

Com relação às viroses, trabalhos recentes mostram que a aplicação de dsRNA e hpRNA induzem proteção contra diferentes vírus em várias espécies vegetais (Tabela 1). Tenllado & Díaz-Ruiz (2001) foram os pioneiros em demonstrar que o uso de moléculas de dsRNA aplicadas exogenamente em plantas pode protegê-las contra infecções virais. Konakalla et al. (2016) relataram que a coinoculação mecânica de TMV e dsRNAs derivados dos genes *p126* e *CP* conferiram resistência ao vírus em tabaco. Em

2018, Kaldis e colaboradores observaram a resistência a *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) em pepino, melancia e abóbora mediante aplicação de dsRNAs direcionados aos genes *HC-Pro* (do inglês, *helper component-proteinase*) e *CP* de ZYMV. Mais recentemente, foi publicado o primeiro estudo mostrando a eficiência do uso tópico de dsRNA para proteção de tomateiros contra um vírus com genoma de DNA, o *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) (Namgial et al., 2019); sendo que todos os trabalhos publicados anteriormente foram realizados com vírus de RNA. Os termos “vacinação baseada em RNA” e “vacinação de dsRNA” têm sido utilizados em estudos envolvendo o controle de viroses com aplicação de duplexes de RNA exógenos (Kaldis et al., 2018; Niehl et al., 2018; Konakalla et al., 2019; Namgial et al., 2019).

Trabalhos resumidos na Tabela 1 confirmam que o efeito antiviral da maquinaria de RNAi é sequência-específica, uma vez que a indução da proteção não foi observada quando RNAs não virais ou RNAs de vírus não-alvos foram utilizados (a exemplo de Tenllado & Díaz-Ruiz, 2001; Worrall et al., 2019; Rêgo-Machado et al., 2020). Além disso, a eficiência da aplicação tópica pode ser dependente da dose e do tamanho das moléculas de duplex de RNA (Tenllado & Díaz-Ruiz, 2001; Rêgo-Machado et al., 2020).

Quanto ao uso da tecnologia de RNAi para controle de nematoides, a estratégia de HIGS foi bastante explorada e plantas transgênicas foram desenvolvidas apresentando resistência a diversas espécies, como *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus vulnus* (Huang et al., 2006; Steeves et al., 2006; Walawage et al., 2013; Banerjee et al., 2018; Kohli et al., 2018; Joshi et al., 2019). Contudo, até o momento, não há relatos sobre a aplicação tópica direta de duplexes de RNA em plantas contra nematoides. A interferência por RNA nestes fitopatógenos vem sendo analisada *in vitro* através da microinjeção, alimentação ou imersão em solução de dsRNA. Como exemplo, a ingestão de dsRNA homólogo a um gene essencial para o parasitismo de *M. incognita* levou à sua menor infectividade. A inoculação de raízes de *Arabidopsis* com espécimes de *M. incognita* em estágio J2 que ingeriram o dsRNA *in vitro* resultou na supressão do desenvolvimento dos nematoides e formação de galhas em menor número e tamanho (Huang et al., 2006). Em outra pesquisa, o silenciamento de um gene-alvo por imersão de *Radopholus similis* em solução de dsRNA inibiu significativamente a sua eclosão e desenvolvimento, além de ter reduzido a sua patogenicidade (Li et al., 2015b).

Por serem, em sua grande maioria, patógenos radiculares, a entrega de RNAs exógenos às plantas para controle de nematoides torna-se um desafio. De acordo com Dubelman e colaboradores (2014), é improvável a persistência e acúmulo de dsRNAs no solo, sendo rapidamente degradados. Em contrapartida, sabe-se que duplexes de RNA são absorvidos por raízes (Hunter et al., 2012; Li et al., 2015a). Logo, formulações de RNAs com compostos estabilizadores capazes de proteger as moléculas e torná-las mais estáveis podem ser administradas através de irrigação do solo como uma alternativa ao manejo de nematoides (Dalakouras et al., 2020).

No que se refere às fitobactérias, tratam-se de organismos procariotos e, portanto, não possuem a maquinaria de RNAi. Entretanto, existem exemplos de sequências bacterianas antisense *trans* e *cis* que hibridizam com RNAs mensageiros e inibem a expressão dos genes-alvos de diferentes maneiras, principalmente por repressão da

tradução (Thomason & Storz, 2010; Georg & Hess, 2011; Good & Stach, 2011); um mecanismo de regulação gênica semelhante ao RNAi. Como uma alternativa para o controle de bactérias, a aplicação exógena de RNAs antisensos pode ser utilizada, embora essas moléculas de fita simples sejam mais suscetíveis a nucleases das plantas e, por isso, precisem de formulações adicionais (Dalakouras et al., 2020). Além disso, é possível realizar o manejo destes fitopatógenos usando estratégias indiretas baseadas em RNAi, como a aplicação de dsRNAs direcionados a insetos que são vetores de bactérias ou dsRNAs homólogos aos genes da planta hospedeira que são essenciais para a aderência, entrada nas células e replicação bacteriana.

## 8. Perspectivas e desafios

A maior parte das ferramentas de manejo fitossanitário visa a proteção de plantas tendo como base o combate às pragas e fitopatógenos. A abordagem explorada neste capítulo, por outro lado, aposta na indução e potencialização da resposta de defesa natural das plantas. Enquanto a agricultura caminhou no passado para a seleção de cultivares com grande produtividade e respostas positivas à adição de insumos agrícolas, como fertilizantes, percebe-se que houve uma tendência à seleção de plantas com baixa imunidade a fitopatógenos em geral. Ainda conhecemos pouco sobre a fisiologia das plantas, principalmente com relação às respostas aos estresses bióticos, mas sabemos da importância da interação entre elas e tudo que as cercam. A aplicação tópica de duplexes de RNA em plantas não resistentes a uma doença, desencadeando uma resposta natural e efetiva de proteção contra o patógeno, pode se tornar uma realidade em campo.

Será possível gerar uma planta resistente a todas as doenças? Difícil, por causa do custo energético para as células e a provável baixa eficiência para múltiplos alvos; mas certamente será possível proteger contra aquele patógeno mais frequente e mais devastador. Para tanto, é preciso aprofundar no conhecimento da relação patógeno-hospedeiro frente aos duplexes de RNA, como por exemplo, detalhes sobre: (i) melhor forma de entrega das moléculas; (ii) transporte, processamento e estabilidade das moléculas; (iii) velocidade de resposta; (iv) durabilidade da proteção; (v) especificidade; e (vi) sensibilidade. Além disso, é necessário selecionar genes-alvos efetivos e avançar nos estudos de síntese dos duplexes de RNA. Outro ponto importante é o custo da aplicação em campo, que precisa ser acessível ao produtor. Finalmente, é preciso regulamentar a comercialização e o uso tópico dos duplexes de RNA, que provavelmente não deverão ser categorizados como afins de agrotóxico e nem como transgênicos. Acreditamos que vale a pena o investimento nesta estratégia. O futuro nos dirá se, de fato, ela será consolidada como uma potente ferramenta de combate aos fitopatógenos.

**Tabela 1.** Estudos envolvendo a aplicação tópica de duplexes de RNA em plantas para o controle de fungos e vírus fitopatogênicos.

Patógeno e (Gene) Alvos	Duplex de RNA	Método de Aplicação	Planta Hospedeira	Efeito	Referência
<b>Fungos Fitopatogênicos</b>					
<i>Fusarium graminearum</i> (CYP51A, CYP51B, e CYP51C)	dsRNA e siRNA	Pulverização	Cevada	Redução do crescimento fúngico; sintomas mais leves; supressão dos transcritos alvos	Koch et al. (2016)
<i>Botrytis cinerea</i> (DCL1 e DCL2)	dsRNA e siRNA	Aplicação direta* e pulverização	Tomate, morango, uva, alface, cebola, rosa e <i>Arabidopsis</i>	Redução do crescimento fúngico; sintomas mais leves; supressão dos transcritos alvos	Wang et al. (2016)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (59 genes) <i>Botrytis cinerea</i> (5 genes homólogos)	dsRNA	Aplicação direta* + Silwet L-77	Canola e <i>Arabidopsis</i>	Redução da infecção por <i>S. sclerotiorum</i> e <i>B. cinerea</i> ; sintomas mais leves	McLoughlin et al. (2018)
<i>Fusarium asiaticum</i> (Myo5)	dsRNA	Pulverização	Trigo	Redução da patogenicidade e resistência ao fungicida fenamacril; supressão do transcrito alvo	Song et al. (2018b)
<i>Fusarium asiaticum</i> ( $\beta_2$ -tubulin)	dsRNA	Pulverização	Pepino, soja, cevada, trigo	Atividade antifúngica de amplo espectro contra <i>F. asiaticum</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Magnaporthe oryzae</i> e <i>Colletotrichum truncatum</i> ; sintomas mais leves; redução da resistência de <i>F. asiaticum</i> ao fungicida carbendazim	Gu et al. (2019)
<b>Vírus Fitopatogênicos<sup>†</sup></b>					
PMMoV (RP) TEV (HC) AMV (RNA3)	dsRNA	Mecânico	<i>N. benthamiana</i> , tabaco e pimenta	Redução dos títulos virais (vírus não detectados); ausência de lesões locais em hospedeiras hipersensíveis; sintomas sistêmicos ausentes ou desenvolvidos tardiamente	Tenllado & Díaz-Ruiz (2001)
PMMoV (RP) PPV (HC e CP)	dsRNA	Mecânico e pulverização	<i>N. benthamiana</i> e tabaco	Redução dos títulos virais (vírus não detectados); ausência de lesões locais em hospedeira hipersensível; sintomas sistêmicos ausentes ou desenvolvidos tardiamente	Tenllado et al. (2003)

Patógeno e (Gene) Alvos	Duplex de RNA	Método de Aplicação	Planta Hospedeira	Efeito	Referência
TMV (CP)	dsRNA e hpRNA	Mecânico	Tabaco	Redução do título viral; sintomas ausentes ou mais leves	Yin et al. (2009)
SCMV (CP)	hpRNA	Pulverização	Milho	Redução na incidência da doença; sintomas ausentes ou mais leves	Gan et al. (2010)
PVY (Nlb)	hpRNA	Mecânico	Tabaco	Redução do título viral; sintomas ausentes ou mais leves	Sun et al. (2010a)
PVY (HC-Pro, Nlb e CP) TMV (RP, MP e CP)	hpRNA	Mecânico	Tabaco	Redução dos títulos virais (vírus não detectados); sintomas ausentes ou mais leves	Sun et al. (2010b)
CymMV (CP)	dsRNA e ssRNA	Mecânico	Orquídea	Supressão do transcrito alvo; sintomas ausentes ou mais leves	Lau et al. (2014)
PSbMV (CP)	dsRNA	Bombardeamento	Ervilha	Redução do título viral; sintomas mais leves	Safarova et al. (2014)
PRSV (CP)	hpRNA	Mecânico	Mamão	Redução do título viral; sintomas ausentes ou desenvolvidos tardiamente	Shen et al. (2014)
TMV (p126 e CP)	dsRNA	Mecânico	Tabaco	Redução do título viral e incidência da doença; sintomas desenvolvidos tardiamente; aumento na biomassa das plantas	Konakalla et al. (2016)
PMMoV (RP) CMV (2b)	hpRNA**	Pulverização	Tabaco e feijão-caupi	Redução do título viral (vírus não detectado); menor porcentagem de infecção em curto e longo prazos; redução no número de lesões locais em hospedeiras hipersensíveis	Mitter et al. (2017a)
ZYMV (HC-Pro e CP)	dsRNA	Mecânico	Pepino, melancia e abóbora	Redução do título viral (vírus não detectado) e incidência da doença; sintomas ausentes	Kaldis et al. (2018)
TMV (RP e rep-MP)	dsRNA	Mecânico e pulverização	<i>N. benthamiana</i>	Redução da disseminação viral local e sistêmica; alterações nos sintomas	Niehl et al. (2018)
SeMV (CP e MP)	dsRNA	Mecânico	<i>Sesbania grandiflora</i>	Redução do título viral e incidência da doença; sintomas desenvolvidos tardiamente	Konakalla et al. (2019)

Patógeno e (Gene) Alvos	Duplex de RNA	Método de Aplicação	Planta Hospedeira	Efeito	Referência
ToLCV (AC1/AC4 e AV1/AV2) CMV(2b)	dsRNA	Mecânico	Tomate e tabaco	Redução do título viral (vírus não detectado) e incidência das doenças; sintomas ausentes	Namgial et al. (2019)
BCMV (Nib e CP)	dsRNA**	Pulverização	<i>N. benthamiana</i> e feijão-caupi	Redução do título viral (vírus não detectado) e da porcentagem de infecção	Worrall et al. (2019)
PRSV (CP e HC-Pro)	dsRNA	Mecânico	Mamão	Redução do título viral (vírus não detectado); sintomas ausentes ou mais leves	Vadlamudi et al. (2020)
ToMV (CP e MP) PVY (CP)	dsRNA	Mecânico e pulverização	Tomate, tabaco e <i>Chenopodium quinoa</i>	Redução dos títulos virais (vírus não detectados) e das taxas de infecção; menor número de lesões locais em hospedeiras hipersensíveis; sintomas ausentes ou mais leves; melhor desenvolvimento das plantas	Rêgo-Machado et al. (2020)

† *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Plum pox virus* (PPV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Potato virus Y* (PVY), *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), *Pea seed borne mosaic virus* (PSbMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Sesbania mosaic virus* (SeMV), *Tomato leaf curl virus* (ToLCV), *Bean common mosaic virus* (BCMV) e *Tomato mosaic virus* (ToMV).

\*Entrega direta das moléculas na superfície da planta (sem mais especificações).

\*\* Moléculas puras ou carregadas em nanopartículas de argila com dupla camada de hidróxido (BioClay).

## 9. Referências bibliográficas

- AALTO, A.P. et al. Large-scale production of dsRNA and siRNA pools for RNA interference utilizing bacteriophage  $\phi 6$  RNA-dependent RNA polymerase. **Rna**, v. 13, p. 422-429, 2007.
- ANDRADE, E.C.; HUNTER, W.B. **RNA interference – Natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC)**. Ed. Abdurakhmonov, I. Y. (Croatia IntechOpen), p. 391-409, 2016.
- ARAGÃO, F.J.L.; NOGUEIRA, E.O.P.L.; TINOCO, M.L.P.; FARIA, J.C. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the *Bean golden mosaic virus*. **Journal of Biotechnology**, v. 166, p. 42-50, 2013.
- AXTELL, M.J. Classification and comparison of small RNAs from plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 5.1-5.23, 2013.
- BALDRICH, P. et al. Plant extracellular vesicles contain diverse small RNA species and are enriched in 10 to 17 nucleotide “tiny” RNAs. **The Plant Cell**, v. 31, p. 315-324, 2019.
- BANERJEE, S. et al. Host delivered RNAi of two cuticle collagen genes, *Mi-col-1* and *Lemmi-5* hampers structure and fecundity in *Meloidogyne incognita*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 2266, 2018.

- BARTOSZEWSKI, R.; SIKORSKI, A.F. Editorial focus: understanding off-target effects as the key to successful RNAi therapy. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 24, p. 1-23, 2019.
- BAUMBERGER, N.; BAULCOMBE, D.C. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 11928-11933, 2005.
- BORGES, F.; MARTIENSSEN, R.A. The expanding world of small RNAs in plants. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, p. 727-741, 2015.
- BRAASCH, D.A. et al. RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. **Biochemistry**, v. 42, p. 7967-7975, 2003.
- CAGLIARI, D. et al. Management of pest insects and plant diseases by non-transformative RNAi. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1319, 2019.
- CAI, Q. et al. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. **Science**, v. 360, p. 1126-1129, 2018.
- CARMELL, M.A.; HANNON, G.J. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 11, p. 214-218, 2004.
- CASTELLANOS, N.L.; SMAGGHE, G.; SHARMA, R.; OLIVEIRA, E.E.; CHRISTIAENS, O. Liposome encapsulation and EDTA formulation of dsRNA targeting essential genes increase oral RNAi-caused mortality in the Neotropical stink bug *Euschistus heros*. **Pest Management Science**, v. 75, p. 537-548, 2019.
- CHURIKOV, N.A.; CHISTIAKOVA, L.G.; ZAVIL'GEL'SKIĬ, G.B.; MANUKHOV, I.V. RNA interference in *Escherichia coli* cells: the expression of molecules that are complementary to the lon gene mRNA in parallel orientation. **Genetika**, v. 36, p. 23-27, 2000.
- COGONI, C. et al. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. **The EMBO Journal**, v. 15, p. 3153-3163, 1996.
- CUNNINGHAM, F.J.; GOH, N.S.; DEMIRER, G.S.; MATOS, J.L.; LANDRY, M.P. Nanoparticle-mediated delivery towards advancing plant genetic engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 36, p. 882-897, 2018.
- DALAKOURAS, A. et al. Delivery of hairpin RNAs and small RNAs into woody and herbaceous plants by trunk injection and petiole absorption. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1253, 2018.
- DALAKOURAS, A. et al. Genetically modified organism-free RNA interference: exogenous application of RNA molecules in plants. **Plant Physiology**, v. 182, p. 38-50, 2020.
- DALAKOURAS, A. et al. Induction of silencing in plants by high-pressure spraying of in vitro-synthesized small RNAs. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1327, 2016.
- DALMAY, T.; HAMILTON, A.; RUDD, S.; ANGELL, S.; BAULCOMBE, D.C. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. **Cell**, v. 101, p. 543-553, 2000.
- DANG, Y.; YANG, Q.; XUE, Z.; LIU, Y. RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. **Eukaryotic Cell**, v. 10, p. 1148-1155, 2011.
- DING, B.; ITAYA, A.; ZHONG, X. Viroid trafficking: a small RNA makes a big move. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 606-612, 2005.
- DONG, Y.; SIEGWART, D.J.; ANDERSON, D.G. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 144, p. 133-147, 2019.

- DUBELMAN, S. et al. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. **PLoS ONE**, v. 9, p. e93155, 2014.
- DUBROVINA, A.S.; KISELEV, K.V. Exogenous RNAs for gene regulation and plant resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 2282, 2019.
- DUNOYER, P. et al. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. **Science**, v. 328, p. 912-916, 2010.
- EDWARDS, C. H. et al. Dendrimer-coated carbon nanotubes deliver dsRNA and increase the efficacy of gene knockdown in the red four beetle *Tribolium castaneum*. **Scientific Reports**, v. 10, p. 12422, 2020.
- EDWARDS, K.A.; BAEUMNER, A.J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, p. 1421-1431, 2006.
- ELBASHIR, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, p. 494-498, 2001.
- FERNANDEZ-CALVINO, L. et al. *Arabidopsis* plasmodesmal proteome. **PLoS ONE**, v. 6, p. e18880, 2011.
- FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.
- FLETCHER, S.J.; REEVES, P.T.; HOANG, B.T.; MITTER, N. A perspective on RNAi-based biopesticides. **Frontiers in Plant Science**, v. 11 p. 51, 2020.
- GAN, D.; ZHANG, J.; JIANG, H.; JIANG, T.; ZHU, S.; CHENG, B. Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. **Plant Cell Reports**, v. 29, p. 1261-1268, 2010.
- GATTA, A.K.; HARIHARAPURA, R.C.; UDUPA, N.; REDDY, M.S.; JOSYULA, V.R. Strategies for improving the specificity of siRNAs for enhanced therapeutic potential. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 13, p. 709-725, 2018.
- GEORG, J.; HESS, W.R. *cis*-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, p. 286-300, 2011.
- GHAG, S.B. Host induced gene silencing, an emerging science to engineer crop resistance against harmful plant pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 100, p. 242-254, 2017.
- GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P.D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 94-108, 2009.
- GHOSAL, A. et al. The extracellular RNA complement of *Escherichia coli*. **Microbiologyopen**, v. 4, p. 252-266, 2015.
- GHOSH, S.K.B.; HUNTER, W.B.; PARK, A.L.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Double strand RNA delivery system for plant-sap-feeding insects. **PLoS One**, v. 12, p. e0171861, 2017.
- GOGOI, A.; SARMAH, N.; KALDIS, A.; PERDIKIS, D.; VOLOUDAKIS, A. Plant insects and mites uptake double-stranded RNA upon its exogenous application on tomato leaves. **Planta**, v. 246, p. 1233-1241, 2017.
- GONSALVES, D. Coat protein transgenic papaya: “acquired” immunity for controlling *Papaya ringspot virus*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 266, p. 73-83, 2002.
- GONSALVES, D. Transgenic papaya: development, release, impact and challenges. **Advances in Virus Research**, v. 67, p. 317-354, 2006.
- GOOD, L.; STACH, J.E.M. Synthetic RNA silencing in bacteria – antimicrobial discovery and resistance breaking. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 185, 2011.

- GOODFELLOW, S.; ZHANG, D.; WANG, M.B.; ZHANG, R. Bacterium-mediated RNA interference: potential application in plant protection. **Plants**, v. 8, p. 572, 2019.
- GU, K. X. et al. A  $\beta$ -*tubulin* dsRNA derived from *Fusarium asiaticum* confers plant resistance to multiple phytopathogens and reduces fungicide resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 153, p. 36-46, 2019.
- GULERIA, P.; MAHAJAN, M.; BHARDWAJ, J.; YADAV, S.K. Plant small RNAs: biogenesis, mode of action and their roles in abiotic stresses. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 9, p. 183-199, 2011.
- GUO, S.; KEMPHUES, K.J. *Par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. **Cell**, v. 81, p. 611-620, 1995.
- HAJERI, S.; KILLINY, N.; EL-MOHTAR, C.; DAWSON, W.O.; GOWDA, S. *Citrus tristeza virus*-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). **Journal of Biotechnology**, v. 176, p. 42-49, 2014.
- HAM, B. K. et al. A polypyrimidine tract binding protein, pumpkin RBP50, forms the basis of a phloem-mobile ribonucleoprotein complex. **The Plant Cell**, v. 21, p. 197-215, 2009.
- HEINLEIN, M.; EPEL, B.L. Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata. **International Review of Cytology**, v. 235, p. 93-164, 2004.
- HOHN, T.; VAZQUEZ, F. RNA silencing pathways of plants: silencing and its suppression by plant DNA viruses. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1809, p. 588-600, 2011.
- HOLEN, T.; AMARZGUIOUI, M.; WIIGER, M.T.; BABAIE, E.; PRYDZ, H. Os efeitos posicionais de pequenos RNAs de interferência direcionados ao fator de tecido desencadeador da coagulação humana. **Pesquisa de Ácidos Nucleicos**, v. 30, p. 1757-1766, 2002.
- HONE, D. **Recombinant double-stranded RNA phage, and use of the same**. U.S. Patent n. 7, 569, 219, 2009.
- HUANG, G.; ALLEN, R.; DAVIS, E.L.; BAUM, T.J.; HUSSEY, R.S. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **PNAS USA**, v. 103, p. 14302-14306, 2006.
- HUANG, L. et al. Efficient and specific gene knockdown by small interfering RNAs produced in bacteria. **Nature biotechnology**, v. 31, p. 350-356, 2013.
- HUNTER, W.B.; GLICK, E.; PALDI, N.; BEXTINE, B.R. Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression. **Southwestern Entomologist**, v. 37, p. 85-87, 2012.
- JACKSON, A. L. et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 635-637, 2003.
- JACOBSEN, S.E.; RUNNING, M.P.; MEYEROWITZ, E.M. Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. **Development**, v. 126, p. 5231-5243, 1999.
- JIANG, L. et al. Systemic gene silencing in plants triggered by fluorescent nanoparticle-delivered double-stranded RNA. **Nanoscale**, v. 6, p. 9965-9969, 2014.
- JOGA, M.R.; ZOTTI, M.J.; SMAGGHE, G.; CHRISTIAENS, O. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 553, 2016.

- JOSHI, I. et al. Development of nematode resistance in *Arabidopsis* by HD-RNAi-mediated silencing of the effector gene *Mi-msp2*. **Scientific Reports**, v. 9, p. 17404, 2019.
- KALDIS, A. et al. Exogenously applied dsRNA molecules deriving from the *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) genome move systemically and protect cucurbits against ZYMV. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, p. 883-895, 2018.
- KAUR, A.; KUMAR, A.; REDDY, M.S. RNA Interference (RNAi) and its role in crop improvement: a review. In: **Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement**. p. 379-394, 2016.
- KAUR, R.; GUPTA, M.; SINGH, S.; JOSHI, N.; SHARMA, A. Enhancing RNAi efficiency to decipher the functional response of potential genes in *Bemisia tabaci* AsiaII-1 (Gennadius) through dsRNA feeding assays. **Frontiers Physiology**, v. 11, p. 123, 2020.
- KAWAMATA, T.; TOMARI, Y. Making risc. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, p. 368-376, 2010.
- KEATES, A.C.; FRUEHAUF, J.; XIANG, S.; LI, C.J. TransKingdom RNA interference: a bacterial approach to challenges in RNAi therapy and delivery. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 25, p. 113-128, 2008.
- KEHR, J.; KRAGLER, F. Long distance RNA movement. **New Phytologist**, v. 218, p. 29-40, 2018.
- KETTING, R.F. The many faces of RNAi. **Developmental cell**, v. 20, p. 148-161, 2011.
- KHVOROVA, A.; REYNOLDS, A.; JAYASENA, S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell**, v. 115, p. 209-216, 2003.
- KITAGAWA, M.; JACKSON, D. Plasmodesmata-mediated cell-to-cell communication in the shoot apical meristem: how stem cells talk. **Plants**, v. 6, p. 12, 2017.
- KOBAYASHI, H.; TOMARI, Y. RISC assembly: coordination between small RNAs and Argonaute proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, p. 71-81, 2016.
- KOCH, A. et al. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. **PLoS Pathogens**, v. 12, p. e1005901, 2016.
- KOCH, A.; KOGEL, K.H. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 821-831, 2014.
- KOHLI, D. et al. Host-mediated RNAi of a Notch-like receptor gene in *Meloidogyne incognita* induces nematode resistance. **Parasitology**, v. 145, p. 1896-1906, 2018.
- KONAKALLA, N.C.; KALDIS, A.; BERBATI, M.; MASARAPU, H.; VOLOUDAKIS, A.E. Exogenous application of double-stranded RNA molecules from TMV p126 and CP genes confers resistance against TMV in tobacco. **Planta**, v. 244, p. 961-969, 2016.
- KONAKALLA, N.C.; KALDIS, A.; MASARAPU, H.; VOLOUDAKIS, A.E. Topical application of double stranded RNA molecules deriving from *Sesbania mosaic virus* (SeMV) CP and MP genes protects Sesbania plants against SeMV. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, p. 1345-1352, 2019.
- KUMAR, P.; PANDIT, S.S.; BALDWIN, I.T. *Tobacco rattle virus* vector: a rapid and transient means of silencing *Manduca sexta* genes by plant mediated RNA interference. **PLoS One**, v. 7, p. e31347, 2012.
- KUNG, Y. et al. Nucleotide sequence-homology-independent breakdown of transgenic resistance by more virulent virus strains and a potential solution. **Scientific Reports**, v. 5, p. 9804, 2015.
- KWAK, P. B.; TOMARI, Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. **Nature structural & molecular biology**, v. 19, p. 145, 2012.

- LAU, S.E. et al. Crude extracts of bacterially-expressed dsRNA protect orchid plants against *Cymbidium mosaic virus* during transplantation from *in vitro* culture. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 89, p. 569-576, 2014.
- LEE, J. Y. et al. Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and *Arabidopsis* recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. **The Plant Cell**, v. 17, p. 2817-2831, 2005.
- LI, H.; GUAN, R.; GUO, H.; MIAO, X. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, p. 2277-2285, 2015a.
- LI, Y. et al. Cathepsin B cysteine proteinase is essential for the development and pathogenesis of the plant parasitic nematode *Radopholus similis*. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, p. 1073-1087, 2015b.
- LIN, Y.H.; HUANG, J.H.; LIU, Y.; BELLES, X.; LEE, H.J. Oral delivery of dsRNA lipoplexes to German cockroach protects dsRNA from degradation and induces RNAi response. **Pest Management Science**, v. 73, p. 960-966, 2017.
- LINDBO, J.A.; DOUGHERTY, W.G. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. **Virology**, v. 189, p. 725-733, 1992.
- LINDBO, J.A.; SILVA-ROSALES, L.; PROEBSTING, W.M.; DOUGHERTY, W.G. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1749-1759, 1993.
- LIU, H. et al. Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2552, 2017.
- LIU, J. et al. Hannon Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, v. 305, p. 1437-1441, 2004.
- MAIZEL, A.; MARKMANN, K.; TIMMERMANS, M.; WACHTER, A. To move or not to move: roles and specificity of plant RNA mobility. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 57, p. 52-60, 2020.
- MANTELIN, S. et al. The receptor-like kinase SlSERK1 is required for Mi-1-mediated resistance to potato aphids in tomato. **The Plant Journal**, v. 67, p. 459-471, 2011.
- MAO, Z. et al. The new *CaSn* gene belonging to the snakin family induces resistance against root-knot nematode infection in pepper. **Phytoparasitica**, v. 39, p. 151-164, 2011.
- MARGIS, R. et al. The evolution and diversification of Dicers in plants. **FEBS Letters**, v. 580, p. 2442-2450, 2006.
- MATZKE, M.A.; PRIMIG, M.; TRNOVSKY, J.; MATZKE, A.J.M. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. **The EMBO Journal**, v. 8, p. 643-649, 1989.
- McLOUGHLIN, A.G. et al. Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **Scientific Reports**, v. 8, p. 7320, 2018.
- MELNYK, C.W.; MOLNAR, A.; BAULCOMBE, D.C. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. **The EMBO Journal**, v. 30, p. 3553-3563, 2011.
- MERMIGKA, G.; VERRET, F.; KALANTIDIS, K. RNA silencing movement in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, p. 328-342, 2016.
- MICURA, R. Small interfering RNAs and their chemical synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, p. 2265-2269, 2002.

- MITTER, N. et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. **Nature Plants**, v. 3, p. 16207, 2017a.
- MITTER, N.; WORRALL, E.A.; ROBINSON, K.E.; XU, Z.P.; CARROLL, B.J. Induction of virus resistance by exogenous application of double-stranded RNA. **Current Opinion in Virology**, v. 26, p. 49-55, 2017b.
- MOGREN, C.L.; LUNDGREN, J.G. In silico identification of off-target pesticidal dsRNA binding in honey bees (*Apis mellifera*). **PeerJ**, v. 5, p. e4131, 2017.
- MONTGOMERY, M.K.; XU, S.; FIRE, A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 15502-15507, 1998.
- MOROZOV, S.Y.; SOLOVYEV, A.G.; KALININA, N.O.; TALIANSKY, M.E. Double-stranded RNAs in plant protection against pathogenic organisms and viruses in agriculture. **Acta Naturae**, v. 11, p. 13-21, 2019.
- MORRIS, K.V.; CHAN, S.W.; JACOBSEN, S.E.; LOONEY, D.J. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. **Science**. v. 305, p. 1289-1292, 2004.
- NAMGIAL, T.; KALDIS, A.; CHAKRABORTY, S.; VOLOUDAKIS, A. Topical application of double-stranded RNA molecules containing sequences of *Tomato leaf curl virus* and *Cucumber mosaic virus* confers protection against the cognate viruses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 108, p. 101432, 2019.
- NANDETY, R.S.; KUO, Y.W.; NOURI, S.; FALK, B.W. Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. **Bioengineered**, v. 6, p. 8-19, 2015.
- NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, v. 2, p. 279-289, 1990.
- NELSON, R. International plant pathology: past and future contributions to global food security. **Phytopathology**, v. 110, p. 245-253, 2020.
- NIEHL, A.; SOININEN, M.; PORANEN, M.M.; HEINLEIN, M. Synthetic biology approach for plant protection using dsRNA. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, p. 1679-1687, 2018.
- NUMATA, K.; OHTANI, M.; YOSHIZUMI, T.; DEMURA, T.; KODAMA, Y. Local gene silencing in plants via synthetic dsRNA and carrier peptide. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 1027-1034, 2014.
- OERKE, E.C. Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science**, v. 144, p. 31-43, 2006.
- PALAUQUI, J.C.; ELMAYAN, T.; POLLIEN, J.M.; VAUCHERET, H. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. **The EMBO Journal**, v. 16, p. 4738-4745, 1997.
- PALLI, S.R. RNA interference in Colorado potato beetle: steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. **Current Opinion in Insect Science**, v. 6, p.1-8, 2014.
- PARENT, J.S., MARTINEZ, A.A.E.; VAUCHERET, H. The origin and effect of small RNA signaling in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p.179, 2012.
- PARKER, J.S. How to slice: snapshots of Argonaute in action. **Silence**, v. 1, p. 3, 2010.
- PHAM, J.W.; PELLINO, J.L.; LEE, Y.S.; CARTHEW, R.W.; SONTHEIMER, E.J.A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. **Cell**, v. 117, p. 83-94, 2004.
- POPEK, S.; HALAGARDA, M. Genetically modified foods: consumer awareness, opinions and attitudes in selected EU countries. **International Journal of Consumer Studies**, v. 41, p. 325-332, 2017.

- RÊGO-MACHADO, C. M. et al. siRNA biogenesis and advances in topically applied dsRNA for controlling virus infections in tomato plants. **Scientific Reports**, v. 10, p. 22277, 2020.
- ROBERTSON, H.D.; WEBSTER, R.E.; ZINDER, N.D. Purification and properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, p. 82-91, 1968.
- ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 3343-3353, 1992.
- ROSA, C.; KUO, Y.W.; WURIYANGHAN, H.; FALK, B.W. RNA interference mechanisms and applications in plant pathology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, p. 581-610, 2018.
- ROSAS-DIAZ, T. et al. A virus-targeted plant receptor-like kinase promotes cell-to-cell spread of RNAi. **PNAS USA**, v. 115, p. 1388-1393, 2018.
- RUIZ, M.T.; VOINNET, O.; BAULCOMBE, D.C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. **Plant Cell**, v. 10, p. 937-946, 1998.
- SAFAROVA, D.; BRAZDA, P.; NAVRATIL, M. Effect of artificial dsRNA on infection of pea plants by *Pea seed-borne mosaic virus*. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 50, p. 105-108, 2014.
- SANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. **Journal of Theoretical Biology**, v. 113, p. 395-405, 1985.
- SAVARY, S. et al.. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, p. 430-439, 2019.
- SCHAUER, S.E.; JACOBSEN, S.E.; MEINKE, D.W.; RAY, A. DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 487-491, 2002.
- SCHWARZ, D.S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, p. 199-208, 2003.
- SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K.S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. **Trends in Plant Science**, v. 16, p. 656-665, 2011.
- SHEN, W. et al. Resistance of non-transgenic papaya plants to *Papaya ringspot virus* (PRSV) mediated by intron-containing hairpin dsRNAs expressed in bacteria. **Acta Virologica**, v. 58, p. 261-266, 2014.
- SOHAIL, M.; DORAN, G.; RIEDEMANN, J.; MACAULAY, V.; SOUTHERN, E.M. A simple and cost-effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 38-38, 2003.
- SONG, J.J.; SMITH, S.K.; HANNON, G.J.; JOSHUA-TOR, L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. **Science**, v. 305, p. 1434-1437, 2004.
- SONG, X. S. et al. Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silencing. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, p. 2543-2560, 2018a.
- SONG, X. S. et al. A *myosin5* dsRNA that reduces the fungicide resistance and pathogenicity of *Fusarium asiaticum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 150, p. 1-9, 2018b.
- STEEVES, R.M.; TODD, T.C.; ESSIG, J.S.; TRICK, H.N. Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction. **Functional Plant Biology**, v. 33, p. 991-999, 2006.
- STRANGE, R.N.; SCOTT, P.R. Plant disease: a threat to global food security. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 83-116, 2005.

- SUN, Z.N.; SONG, Y.Z.; YIN, G.H.; ZHU, C.X.; WEN, F.J. HpRNAs derived from different regions of the *Nlb* gene have different abilities to protect tobacco from infection with *Potato virus Y*. **Journal of Phytopathology**, v. 158, p. 566-568, 2010a.
- SUN, Z. N. et al. Bacterially expressed double-stranded RNAs against hotspot sequences of tobacco mosaic virus or potato virus Y genome have different ability to protect tobacco from viral infection. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1901-1914, 2010b.
- TANING, C. N. T. et al. Engineered flock house virus for targeted gene suppression through RNAi in fruit flies (*Drosophila melanogaster*) *in vitro* and *in vivo*. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 805, 2018.
- TENLLADO, F.; DÍAZ-RUÍZ, J.R. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. **Journal of Virology**, v. 75, p. 12288-12297, 2001.
- TENLLADO, F.; MARTÍNEZ-GARCÍA, B.; VARGAS, M.; DÍAZ-RUÍZ, J.R. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. **BMC Biotechnology**, v. 3, p. 3, 2003.
- THOMASON, M.K.; STORZ, G. Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? **Annual Review of Genetics**, v. 44, p. 167-188, 2010.
- UNNAMALAI, N.; KANG, B.G.; LEE, W.S. Cationic oligopeptide-mediated delivery of dsRNA for post-transcriptional gene silencing in plant cells. **FEBS Letters**, v. 566, p. 307-310, 2004.
- VADLAMUDI, T. et al. DsRNA-mediated protection against two isolates of *Papaya ringspot virus* through topical application of dsRNA in papaya. **Journal of Virological Methods**, v. 275, p. 113750, 2020.
- VAN BLOKLAND, R.; VAN D. G.N.; MOL, J.N.M.; KOOTER, J.M. Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. **The Plant Journal**, v. 6, p. 861-877, 1994.
- VAN DER LINDE, K.; KASTNER, C.; KUMLEHN, J.; KAHMANN, R.; DOEHLEMANN, G. Systemic virus-induced gene silencing allows functional characterization of maize genes during biotrophic interaction with *Ustilago maydis*. **New Phytologist**, v. 189, p. 471-483, 2011.
- VATANPARAST, M.; KIM, Y. Optimization of recombinant bacteria expressing dsRNA to enhance insecticidal activity against a lepidopteran insect, *Spodoptera exigua*. **PLoS One**, v. 12, p. e0183054, 2017.
- VAZQUEZ, F.; HOHN, T. Biogenesis and biological activity of secondary siRNAs in plants. **Scientifica**, v. 2013, p. 1-12, 2013.
- VOINNET, O. Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. **Trends in Plant Science**, v. 13, p. 317-328, 2008.
- VOINNET, O.; BAULCOMBE, D.C. Systemic signalling in gene silencing. **Nature**, v. 389, p. 553-553, 1997.
- WALAWAGE, S. L. et al. Stacking resistance to crown gall and nematodes in walnut rootstocks. **BMC Genomics**, v. 14, p. 668, 2013.
- WANG, H.L.; CHEKANOVA, J.A. Small RNAs: essential regulators of gene expression and defenses against environmental stresses in plants. **Wiley Interdisciplinary Reviews-RNA**, v. 7, p. 356-381, 2016.
- WANG, H. W. et al. Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, p. 1148, 2009.
- WANG, M.; DEAN, R.A. Movement of small RNAs in and between plants and fungi. **Molecular Plant Pathology**, v. 21, p. 589-601, 2020.

- WANG, M.; JIN, H. Spray-induced gene silencing: a powerful innovative strategy for crop protection. **Trends in Microbiology**, v. 25, p. 4-6, 2017.
- WANG, M. et al.. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. **Nature Plants**, v. 2, p. 16151, 2016.
- WANG, X. B. et al. RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. **PNAS USA**, v. 107, p. 484-489, 2010.
- WANG, Y. et al. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. **Nature**, v. 461, p. 754-761, 2009.
- WANI, S.H.; SANGHERA, G.S.; SINGH, N.B. Biotechnology and plant disease control-role of RNA interference. **American Journal of Plant Sciences**, v. 1, p. 55-68, 2010.
- WATSON, J.M.; FUSARO, A.F.; WANG, M.; WATERHOUSE, P.M. RNA silencing platforms in plants. **FEBS Letters**, v. 579, p. 5982-5987, 2005.
- WATTS, J.K.; DELEAVEY, G.F.; DAMHA, M.J. Chemically modified siRNA: tools and applications. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 842-855, 2008.
- WHYARD, S.; SINGH, A.D.; WONG, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 824-832, 2009.
- WORRALL, E. A. et al. Exogenous application of RNAi-inducing double-stranded RNA inhibits aphid-mediated transmission of a plant virus. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 265, 2019.
- WURIYANGHAN, H.; FALK, B.W. RNA Interference towards the potato psyllid, *Bactericera cockerelli*, is induced in plants infected with recombinant *Tobacco mosaic virus* (TMV). **PLoS One**, v. 8, p. e66050, 2013.
- XIANG, S. et al. *In vitro* and *in vivo* gene silencing by TransKingdom RNAi (tkRNAi). In: **siRNA and miRNA Gene Silencing**. Humana Press, v. 487, p. 1-14, 2009.
- YAO, M.C.; FULLER, P.; XI, X. Programmed DNA deletion as an RNA-guided system of genome defense. **Science**, v. 300, p. 1581-1584, 2003.
- YIN, G. et al. Production of double-stranded RNA for interference with TMV infection utilizing a bacterial prokaryotic expression system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 323-333, 2009.
- ZHANG, H. et al. DNA nanostructures coordinate gene silencing in mature plants. **PNAS USA**, v. 116, p. 7543-7548, 2019.
- ZHANG, W. et al. tRNA-related sequences trigger systemic mRNA transport in plants. **The Plant Cell**, v. 28, p. 1237-1249, 2016.
- ZHANG, X. et al. Mini review: revisiting mobile RNA silencing in plants. **Plant Science**, v. 278, p.113-117, 2019.
- ZHANG, Z. J. Artificial trans-acting small interfering RNA: a tool for plant biology study and crop improvements. **Planta**, v. 239, p. 1139-1146, 2014.
- ZOTTI, M. et al. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. **Pest Management Science**, v. 74, p. 1239-1250, 2018.