Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Avaliação da interação entre ácaros *Brevipalpus yothersi* Baker (1949) e o vírus da leprose dos citros C (CiLV-C)

Thais Elise Sinico

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2018

Thais Elise Sinico
Licenciada em Ciências Biológicas

Avaliação da interação entre ácaros *Brevipalpus yothersi* Baker (1949) e o vírus da leprose dos citros C (CiLV-C)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **JULIANA FREITAS-ASTÚA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Sinico, Thais Elise

Avaliação da interação entre ácaros *Brevipalpus yotheresi* Baker (1949) e o vírus da leprose dos citros C (CiLV-C) / Thais Elise Sinico. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

76 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Interação vírus-vetor 2. Transcriptoma 3. RNAseq 4. *Cilevirus*. I.
Título

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo n. 2014/08458-9), pelo auxílio financeiro.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade da realização do mestrado e pelo crescimento acadêmico.

Ao Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” – IAC e ao Dr. Marcos Antônio Machado, pela disponibilização da infraestrutura para a realização deste trabalho.

À Dra. Juliana de Freitas-Astúa, pela orientação, paciência e ensinamentos, contribuindo para o meu crescimento profissional.

À Dra. Valdenice Moreira Novelli, pela oportunidade e ensinamentos diários ao longo desses cinco anos de Centro de Citricultura.

À Dra. Maria Andréia Nunes, pelos ensinamentos, confiança, amizade, e por sempre acreditar que posso dar o meu melhor.

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima, pela disponibilidade e apoio.

À Ms. Gabriella Dias Arena, pela disponibilidade e ajuda essencial nas análises de bioinformática.

À Graziela, Sílvia, Camila e Lísia, pelo carinho e amizade ao longo desses anos, sempre me apoiando e incentivando em todos os bons e maus momentos.

A todos os amigos do grupo Leprose (não citarei nomes, pois foram tantos, e todos contribuíram com o meu crescimento profissional e pessoal), pela amizade, apoio e incansáveis coletas de ácaros.

Aos funcionários e amigos do Centro de Citricultura, pela amizade, conversas e apoio em todos os momentos.

Às minhas amigas Paula e Aline, que apesar da distância durante esses anos, sempre apoiaram as minhas escolhas e, o mais importante, nunca desistiram de mim.

À minha família, pelo amor incondicional, incentivo e apoio em todas as minhas decisões.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Leprose dos citros e ácaros <i>Brevipalpus</i> spp.	11
2.2. Ácaros <i>Brevipalpus</i> spp.: taxonomia e biologia	13
2.3. Estudos da interação vírus-vetor	15
2.4. Genômica funcional e ácaros pragas	19
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo Geral	25
3.2. Objetivos Específicos.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Material biológico	27
4.2. Extração de RNA total de ácaros <i>B. yothersi</i>	28
4.3. Detecção de CiLV-C: síntese de cDNA e PCR.....	28
4.4. Sequenciamento de RNA e análise da expressão gênica.....	29
4.5. Validação da expressão gênica diferencial	31
4.5.1. Seleção de genes e validação de primers por RT-PCR.....	31
4.5.2. Validação da expressão gênica por RT-qPCR.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Extração de RNA total de ácaros <i>B. yothersi</i>	35
5.2. Detecção de CiLV-C: síntese de cDNA e PCR.....	36
5.3. Sequenciamento de RNA e análise de qualidade	37
5.4. Análise da expressão gênica diferencial	38
5.5. Análise funcional	43
5.6. Validação da expressão gênica diferencial (RNAseq)	44
5.6.1. Seleção de genes de interesse e validação por RT-PCR.....	44
5.6.2. Validação por RT-qPCR.....	47
6. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	63

RESUMO

Avaliação da interação entre ácaros *Brevipalpus yothersi* Baker (1949) e o vírus da leprose dos citros C (CiLV-C)

Ácaros *Brevipalpus yothersi* Baker (1949) são vetores do citrus leprosis virus C (CiLV-C), o mais comum causador da leprose dos citros. Esta é considerada, atualmente, a doença viral de maior importância na cultura dos citros no Brasil e ocorre também em países da América do Sul e Central, além do México, na América do Norte. A doença prejudica a vida útil da planta, devido à queda de folhas e frutos, e seca de ramos, podendo levá-la à morte quando o ataque é demasiadamente severo. O controle e manejo da leprose são basicamente atribuídos ao uso de acaricidas, demandando dos produtores um acréscimo significativo no orçamento por defensivos agrícolas e potencial risco ao ambiente. Nos últimos anos, análises de expressão gênica (transcriptoma), envolvendo ácaros praga da agricultura, resultaram em informações importantes como o envolvimento de genes específicos no processo de resistência a acaricidas e desenvolvimento biológico. No entanto, ainda pouco se sabe sobre a interação do ácaro *B. yothersi* com o CiLV-C, tornando o estudo de transcriptoma muito significativo para a obtenção de informações aprofundadas sobre o atípico padrão vírus-vetor do patossistema leprose. Assim, através do sequenciamento de RNA (RNAseq), foi investigado o perfil de expressão diferencial entre ácaros *B. yothersi* virulíferos e avirulíferos. O RNAseq foi realizado em sistema Illumina HiSeq 2500, e os dados analisados com base em linguagem R e ferramentas do software Bioconductor. Os *reads* sequenciados foram mapeados no genoma de *B. yothersi* e foi feita análise de expressão utilizando DESeq2. Foram observados 5.690 genes diferencialmente expressos (GDE), sendo 2.736 transcritos induzidos em ácaros virulíferos. Os GDE foram analisados em banco de dados do NCBI, buscando por proteínas similares em artrópodes. Dentre os transcritos induzidos em *B. yothersi*, potencialmente em resposta ao CiLV-C, foram encontrados genes relacionados ao processo de detoxificação de xenobióticos, metabolismo primário e imunidade, com possível envolvimento na interação vírus-vetor. A expressão de 23 genes foi verificada por RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). As análises indicaram que os genes envolvidos em detoxificação são induzidos durante a interação entre o ácaro da leprose e o CiLV-C.

Palavras-chave: Interação vírus-vetor; Transcriptoma; RNAseq; *Cilevirus*

ABSTRACT

Evaluation of the interaction between mites *Brevipalpus yothersi* Baker (1949) and citrus leprosis virus C (CiLV-C)

The false spider mite *Brevipalpus yothersi* Baker (1949) is recognized as vector of citrus leprosis virus C (CiLV-C), the most common causal agent of citrus leprosis disease. Currently, it is considered the viral disease of major importance in citrus in Brazil and occurs in countries of South and Central America, as well as in Mexico, North America. It reduces the lifespan of the plants due to leaf and fruit drop, dried branches, and can lead to death when the attack is severe. The management of leprosis is based primarily on the chemical control of the mite vector, increasing significantly the cost of production and harming the environment. On the last years, gene expression (transcriptome) analyzes involving phytophagous mites resulted in important data, such as the involvement of specific genes in the process of resistance to acaricides and biological development. However, there is little information about *B. yothersi*-CiLV-C interaction, making the transcriptome a very interesting tool to obtaining data regarding the atypical virus-vector relationship of the leprosis pathosystem. RNA sequencing (RNAseq) was used to investigate the differential expression profiles between viruliferous and aviruliferous *B. yothersi* mites. The RNAseq was performed using the Illumina HiSeq 2500 system, the data were analyzed using the R language and Bioconductor software packages. The sequenced reads were mapped on the genome of *B. yothersi* and expression analysis was performed in DESeq2. We identified 5.690 differentially expressed genes (DEGs), of which 2.736 transcripts were induced in viruliferous mites. The DEGs were analyzed in NCBI database, searching for similar proteins in arthropods. Among the transcripts induced in response to CiLV-C, there are genes related to the detoxification of xenobiotics, primary metabolism, immunity and possible involvement in the virus-vector interaction. Expression of 23 genes was verified by quantitative real-time RT-PCR (RT-qPCR). The analyzes indicate that detoxification genes are induced during the interaction between the false spider mite and CiLV-C.

Keywords: Virus-vector interaction; Transcriptome; RNAseq; *Cilevirus*

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira se destaca mundialmente pela produção de laranja doce e comercialização de suco concentrado, sendo que 97% de sua produção é destinada para exportação (NEVES et al., 2017). Recentemente, o Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) divulgou que a safra 2017/18 das principais regiões citrícolas do Brasil, representadas por São Paulo e Triângulo/Sudoeste de Minas Gerais, ficou em 398,35 milhões de caixas de 40 kg, uma produção 62% maior que a safra anterior (FUNDECITRUS, 2018).

Porém, mesmo com esta expressiva safra, a produtividade brasileira poderia ser maior caso não houvesse tantos problemas fitossanitários atribuídos a pragas e doenças, o que demanda gastos elevados com medidas de controle (NEVES et al., 2010; FERREIRA et al., 2013; SILVA; SCARE, 2015). Dentre as doenças virais com maior impacto ao setor encontra-se a leprose dos citros, com ocorrência em todo o continente Americano (BASTIANEL et al., 2010; KITAJIMA et al., 2014) e com relato de sintomas similares no Havaí (MELZER et al., 2012).

A sintomatologia da leprose dos citros é caracterizada pelo aparecimento de lesões cloróticas e/ou necróticas localizadas em folhas, frutos e ramos. Em plantas com estado mais avançado da doença ocorre desfolha, queda prematura de frutos e seca de ramos, ocasionando até a morte da planta (BASTIANEL et al., 2006; 2010).

O principal agente causal da leprose dos citros é o citrus leprosis virus C (CiLV-C), membro tipo do gênero *Cilevirus* (LOCALI-FABRIS et al., 2012), e sua transmissão é realizada por ácaros do gênero *Brevipalpus* Donnadieu, um dos grupos mais importantes da família Tenuipalpidae (CHILDERS et al., 2003a; BEARD et al., 2015). O CiLV-C é um vírus não sistêmico, ou seja, não atinge os vasos do floema da planta, sendo os sintomas em torno ao sítio de alimentação do ácaro vetor. Este, por sua vez, perfura as células do mesófilo vegetal com auxílio de um estilete retrátil, injeta saliva e, posteriormente, ingere o conteúdo celular através da retração do estilete. Assim, a alimentação é essencial para o sucesso da aquisição e inoculação do CiLV-C (KITAJIMA; ALBERTI, 2014).

Ácaros *Brevipalpus* spp. são polípagos e cosmopolitas, colonizando citros e outras culturas de importância econômica, a exemplo do café, maracujá, além de plantas ornamentais, como as orquídeas (KITAJIMA et al., 2010). Estes, pertencem a um complexo

morfológico de espécies pragas e vetoras de uma diversidade de vírus de plantas, comumente chamados de VTBs (vírus transmitidos por *Brevipalpus*). Os VTBs são divididos em dois grupos de acordo com o sítio de replicação na planta hospedeira, sendo que os VTB-C (citoplasmáticos) se multiplicam no citoplasma de células infectadas, enquanto os VTB-N (nucleares) replicam no núcleo (KITAJIMA et al., 2003; BASTIANEL et al., 2010; RODRIGUES et al., 2016). O principal ácaro associado à leprose dos citros é o *Brevipalpus yothersi* (ROY et al., 2015; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016).

Análises do genoma e transcriptoma de insetos têm permitido obter informações sobre a interação vírus-vetor, a exemplo dos estudos realizados com *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), vetoras de begomovírus, e afídeos vetores de luteovírus, com dados importantes sobre existência de receptores associados à entrada dos vírus nos corpos dos insetos (FERRERES; RACCAH, 2015; ROSEN et al., 2015). Entretanto, conhecimento da base genética de ácaros ainda são escassos, e os poucos trabalhos realizados são com ácaros da família Tetranychidae, para os quais estudos de expressão gênica forneceram dados acerca de genes associados à resistência a acaricidas e relacionados a parâmetros biológicos (GRBIC et al., 2011; BAJDA et al., 2015; HOY et al., 2016). Todavia, estes não são vetores de vírus de plantas.

Técnicas como o sequenciamento de RNA (RNAseq) permitem suposições quanto a resposta de vetores à aquisição de diferentes tipos de vírus de plantas, além de informações sobre a atuação e regulação de genes responsivos à presença de vírus, tanto na planta hospedeira como no vetor (KAUR et al., 2016). Nesse sentido, o conhecimento sobre a expressão desses genes e suas vias dentro do vetor pode levar ao desenvolvimento de estratégias como uso de RNA de interferência (RNAi) ou aplicação de técnicas de edição de genoma para controle do vetor e do vírus (GU; KNIPPLE, 2013; KAUR et al., 2016).

Os estudos da interação molecular entre *B. yothersi* e CiLV-C são inexistentes e a análise do transcriptoma do ácaro *B. yothersi* é uma abordagem inédita. Esta análise visa à obtenção de informações importantes como a identificação de genes de caráter funcional e de possíveis receptores associados ao CiLV-C. Com este intuito, foi realizado o transcriptoma de populações virulíferas e avirulíferas de *B. yothersi*, para avaliação comparativa do perfil de expressão e a identificação de genes diferencialmente expressos (GDE).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leprose dos citros e ácaros *Brevipalpus* spp.

Alguns ácaros do gênero *Brevipalpus* Donnadieu (Acari: Tenuipalpidae) possuem importância econômica por serem vetores de vírus em frutíferas e ornamentais (CHILDERS; DERRICK, 2003; KITAJIMA et al., 2003). Dentre as doenças causadas pelos vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTB) que afetam culturas de importância agrícola, se destacam a leprose dos citros, a mancha anular do cafeeiro, a pinta verde do maracujá e a mancha da orquídea (KITAJIMA et al., 2003).

No Brasil, a principal doença viral que acomete a maioria dos pomares de laranja doce é a leprose dos citros, transmitida pelo ácaro *Brevipalpus yothersi* (BASTIANEL et al., 2006; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016). A citricultura paulista, maior produtora de suco de laranja do mundo, sofre danos significativos em seus pomares devido aos diversos problemas fitossanitários, e demanda gastos elevados com o uso de defensivos agrícolas para controle de pragas e vetores (FERREIRA et al., 2013). Dentre estes, os acaricidas representam aproximadamente 60% de todos os pesticidas comercializados pelo setor (SILVA; SCARE, 2015). E, mais recentemente, dado o crescimento das vendas de acaricidas também no mercado europeu, é constante a preocupação com os danos ambientais e o possível favorecimento de populações de ácaros resistentes (VAN LEEUWEN et al., 2014).

Os sintomas da leprose dos citros (Figura 1) são bastante peculiares, apresentando manchas cloróticas e/ou necróticas restritas ao local de alimentação do ácaro, como folhas, frutos e ramos (BASTIANEL et al., 2006). Conforme a severidade dos sintomas pode ocorrer depreciação dos pomares, afetando a vida útil e, em estágio avançado, levando à morte da planta (BASTIANEL et al., 2006; 2010).

Figura 1. Sintomas da leprose dos citros: lesões cloróticas em folha (A), lesões necróticas em ramos (B) e fruto (C), e estágio avançado da doença com depreciação total da planta (D). (Fotos: Lab. de Acarologia, CCSM – IAC).

Estes sintomas típicos de leprose podem ser atribuídos a vírus distintos: CiLV-C (LOCALI-FABRIS et al., 2006), citrus leprosis virus C 2 (CiLV-C2) (ROY et al., 2013a), orchid fleck virus strain citrus (OFV-citrus) (ROY et al., 2013b; DIETZGEN et al., 2014; AFONSO et al., 2016) e citrus leprosis virus N (CiLV-N) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017). Os dois primeiros, pertencentes a espécies do gênero *Cilevirus* (LOCALI-FABRIS et al., 2006; 2012), acumulam e replicam no citoplasma de células infectadas e são, portanto, do tipo citoplasmático (VTB-C). Já o OFV-citrus e o CiLV-N são, respectivamente, membros aceito e tentativo do gênero *Dichorhavirus* (DIETZGEN et al., 2014; AFONSO et al., 2016), multiplicando-se no núcleo de células infectadas (VTB-N). Há ainda relato de hibiscus green spot virus 2 (HGSV2), membro-tipo e única espécie aceita do gênero *Higrevirus*, causando sintomas similares à leprose em limão Volkameriano e laranja doce no Havaí e na Colômbia, respectivamente (MELZER et al., 2012; ROY et al., 2014). Apesar de não ser comprovadamente transmitido por *Brevipalpus*, o HGSV2 tem associação com ácaros desse gênero e multiplica-se no citoplasma de células infectadas. Embora com toda essa diversidade, o CiLV-C é considerado prevalente na maior parte dos casos e, até o momento, é o único vírus associado à leprose citoplasmática no Brasil.

Com a ampla distribuição do vetor e estes relatos de novos vírus, a leprose passou a ser preocupante também para outros países das Américas, como Bolívia, Colômbia, Venezuela, Panamá, Honduras, Guatemala e México, se tornando uma ameaça principalmente para os Estados Unidos, um dos principais produtores de laranja do mundo, que desde o final da década de 1960 não apresentam relato da doença (BASTIANEL et al., 2010; RODRIGUES; CHILDERS, 2013; KITAJIMA et al., 2014).

Em função dessa dispersão recente, a leprose tem sido considerada uma doença re-emergente (ROY et al. 2015). Além disso, a leprose era considerada uma doença com gama extremamente reduzida de hospedeiras (COLARICCIO et al., 1995). No entanto, estudos sobre o CiLV-C ampliaram significativamente o número de hospedeiras experimentais, chegando a 48 espécies vegetais (NUNES et al., 2012a; ARENA et al., 2013; GARITA et al., 2014), e também naturais, como *Swinglea glutinosa* (LÉON et al., 2008) e *Commelina benghalensis* (NUNES et al., 2012b).

Com o aumento da distribuição geográfica da doença, relevância econômica e científica, diversas publicações vêm divulgando informações sobre a leprose, reforçando a importância de se conhecer este atípico padrão de interação vírus-planta-vetor (ROY et al., 2013a; ROY et al., 2015; HARTUNG et al., 2015; ARENA et al., 2016). Lembrando que, dado o agente causal ser um vírus de caráter não sistêmico, a presença do ácaro vetor e a existência de plantas sintomáticas são condições obrigatórias para a disseminação da doença nos pomares (BASSANEZI et al., 2012) e o conhecimento de todos os atores envolvidos no patossistema é de extrema importância para o manejo e o controle adequados da doença.

2.2. Ácaros *Brevipalpus* spp.: taxonomia e biologia

O gênero *Brevipalpus* é representado por mais de 300 espécies (BEARD et al., 2015) que, devido ao seu hábito polífago e cosmopolita, apresenta ampla distribuição mundial (CHILDERS et al., 2003a). Dentro do gênero, as espécies *B. phoenicis sensu lato* (s.l.) (Geijskes), *B. obovatus* Donnadieu e *B. californicus* (Banks) se destacam pelo impacto no setor agrícola, conforme mencionado anteriormente, por serem vetores de fitovírus em culturas de importância econômica, como citros, café e orquídeas (CHILDERS et al., 2003b; KITAJIMA et al., 2014).

A espécie *B. phoenicis* s.l. foi por muito tempo associada à transmissão do CiLV-C. Todavia, devido a relatos de variações morfológicas intraespecíficas, sugerindo a existência de espécies crípticas (MINEIRO et al., 2013; NAVIA et al., 2013), foi realizada uma re-descrição taxonômica da espécie. Estudos de Beard et al. (2015) com base em caracteres morfológicos, como o padrão de estrias cuticulares, placas ventrais e genitais, e o formato da espermateca, levaram à separação da espécie em oito tipos morfológicos, abrangendo quatro novas espécies (*B. azores* sp. nov. Beard & Ochoa, *B. feresi* sp. nov. Ochoa & Beard, *B.*

ferraguti sp. nov. Ochoa & Beard, *B. tucuman* sp. nov. Beard & Ochoa) e quatro espécies recuperadas e redescritas [*B. hondurani* Evans (1993), *B. papayensis* Baker (1949), *B. phoenicis* (Geijskes) *sensu stricto* Baker (1949) e *B. yothersi* Baker (1949)].

Nos pomares de citros têm sido identificados ácaros das espécies *B. yothersi* e *B. papayensis* (SÁNCHEZ-VELÁZQUEZ et al., 2015; MINEIRO et al., 2017), estando a primeira espécie intimamente associada à transmissão do CiLV-C (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016). Já *B. papayensis* está relacionado com a transmissão do vírus da mancha anular do cafeeiro (coffee ringspot virus, CoRSV) e, embora com baixa eficiência, também ao vírus da leprose CiLV-C (NUNES et al., 2017). Outra espécie encontrada, mas em baixa incidência e apenas em pomares de fundo de quintal é *B. phoenicis* s.s., vetor do CiLV-N (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017).

Ácaros *Brevipalpus* spp. possuem o corpo achatado dorso-ventralmente, com coloração avermelhada, quatro pares de pernas e apresentam quatro estágios de desenvolvimento após a eclosão do ovo: larva, protoninfa, deutoninfa e adulto (Figura 2), sendo que o ciclo biológico completo pode variar de 14-40 dias, dependendo das condições de temperatura e umidade (HARAMOTO, 1969; CHIAVEGATO, 1996).

Figura 2. Diferentes fases do desenvolvimento biológico de ácaros *Brevipalpus* spp.: ovo (A), larva (B), protoninfa (C), deutoninfa (D) e fêmea adulta (E). (Fotos: Lab. de Acarologia, CCSM – IAC).

Esses ácaros apresentam peculiaridades como o estado de haploidia (n), presença de somente dois cromossomos homólogos e reprodução por partenogênese telítica, onde os ovos não fertilizados geram fêmeas haplóides (WEEKS, 2001). Isso acontece devido à associação com uma bactéria endossimbionte do gênero *Cardinium*, que ocasiona a feminilização desses ácaros. Assim, os machos são de baixa ocorrência na população (>5%) e com função desconhecida, pois não fecundam as fêmeas e podem ser obtidos experimentalmente por meio de tratamento com antibióticos (WEEKS, 2001; GROOT; BREEUWER, 2006; NOVELLI et al., 2007).

2.3. Estudos da interação entre vírus e artrópodes vetores

Os modelos de interação vírus-vetor foram baseados em mecanismos envolvendo vírus-insetos, mas podem ser adaptados para outros sistemas. Nesse sentido, para compreender os mecanismos na interação de um vírus com seu vetor, é preciso conhecer o modo de transmissão (Figura 3), podendo ser identificado como não-persistente, quando o vírus fica retido no estilete do vetor; semi-persistente, quando a retenção se dá na região do estomodeu (compreende a faringe, cibário e pré-cibário); ou persistente, quando partículas virais circulam livremente pelo vetor. Os vírus persistentes, podem ser divididos em dois tipos: circulativos não-propagativos, quando não ocorre replicação das partículas virais no corpo do vetor; e circulativos propagativos, quando ocorre replicação viral no vetor e, para isso, o vírus necessita de um período de latência longo (dias-semanas) para sua maturação e efetiva transmissão (HULL, 2002; HOGENHOUT et al., 2008; WHITFIELD et al., 2015; DÁDER et al., 2017).

Figura 3. Diagrama esquemático do modo de transmissão de vírus por insetos vetores. As setas brancas indicam a rota de vírus circulativos pelo corpo do vetor: as partículas virais circulam pelo canal salivar e atravessam o intestino médio e posterior até alcançar a hemocele, para então retornarem ao canal salivar. Vírus não-circulativos encontram-se retidos no estilete (hexágonos vermelhos), podendo se ligar a receptores específicos (1) ou interagir com proteínas auxiliares (2-3). Abreviações: FG: intestino anterior; MG: intestino médio; HG: intestino posterior; HC: componentes auxiliares (Adaptado de Blanc et al., 2014).

Para alguns vírus transmitidos por insetos de maneira persistente circulativa são conhecidas diversas barreiras no interior do vetor a serem ultrapassadas até a efetiva transmissão. Uma vez ingeridas, as partículas virais são transportadas do trato digestivo, atravessando a membrana do intestino até alcançar a hemocèle do inseto para, posteriormente, atingir as glândulas salivares e, por meio da egestão de saliva durante a alimentação, e serem entregues à planta hospedeira (CZOSNEK; GHANIM, 2012). Na interação dos insetos vetores, como a mosca-branca *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) com begomovirus (*Geminiviridae*) e de afídeos com luteovirus (*Luteoviridae*), existe alta especificidade e íntima associação, envolvendo proteínas codificadas por ambos (LINZ et al., 2015; ROSEN et al., 2015). Dentre estas, incluem-se receptores específicos com a função, por exemplo, de facilitar a entrada do vírus no interior das células do vetor (GRAY, 1996; VAN DEN HEUVEL et al., 1999; NG; FALK, 2006; FERERES; RACCAH, 2015; ROSEN et al., 2015). Por exemplo, a capa proteica do vírus também pode interagir com receptores de *B. tabaci* permitindo o transporte das partículas virais, desde a ingestão até o momento em que atinge as glândulas salivares (HÖFER et al., 1997). Acredita-se que essa relação (vírus-vetor) decorra de um processo coevolutivo, no qual os capsídeos virais passaram por mudanças conformacionais para se adequarem aos receptores destes vetores (CZOSNEK; GHANIM, 2012).

O begomovirus tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), transmitido exclusivamente pela mosca-branca *B. tabaci*, tem a transmissão e circulação facilitada por proteínas produzidas por bactérias endossimbiontes (GOTTLIEB et al., 2010; KANAKALA; GHANIM, 2016). A proteína denominada GroEL, produzida pelo endossimbionte *Hamiltonella* presente no vetor, tem papel fundamental na sobrevivência dos vírus ao evitar a degradação das partículas virais na hemolinfa dos insetos (MORIN et al., 1999). Esta interação ocorre por meio da ligação entre as proteínas GroEL e a capa proteica viral, sendo que eventuais falhas neste processo podem levar à diminuição na eficiência da transmissão do vírus (MORIN et al., 2000).

Em estudos investigando quais proteínas de *B. tabaci* poderiam interagir com TYLCV, foi observado que o nível de expressão da proteína *cyclophilina-B* (CypB) em mosca-branca foi alterado após aquisição e retenção viral, sugerindo que CypB desempenha um importante papel no processo de inoculação de TYLCV por *B. tabaci* (KANAKALA; GHANIM, 2016). Já em trabalho de anotação genômica, que incluiu informações sobre a interação

entre o pulgão da ervilha *Acyrtosiphon pisum* e os luteovírus pea enation mosaic virus (PEMV) e soybean dwarf virus (SbDV), foram observados genes que codificam proteínas envolvidas em mecanismos de “membrane-trafficking”, endocitose, transporte de vesículas e exocitose, ou seja, supostamente envolvidas neste processo de transcitose implícito à transmissão viral (TAMBORINDEGUY et al., 2010).

Em 2010, Liu et al. isolaram o resíduo de um peptídeo (GBP3.1) que se liga ao intestino de pulgões vetores, o qual supostamente impediria a absorção do vírus pelo vetor. Experimentos utilizando plantas transgênicas expressando este peptídeo apresentaram uma significativa redução na inoculação de PEMV por pulgões, corroborando com a suposição de que esse peptídeo estaria competindo com o vírus por um sítio de ligação no intestino no pulgão. Posteriormente, por meio de estudos *in vitro* e de proteômica, estes dados *in vivo* foram confirmados identificando-se o primeiro receptor em vetor de fitovírus para a capa proteica de PEMV - a proteína de membrana “alanine aminopeptidase N” (APN), presente no intestino do pulgão *A. pisum* (LINZ et al., 2015).

Os vírus transmitidos de maneira persistente propagativa, como os membros dos gêneros *Orthotospovirus* (família *Tospoviridae*) e, possivelmente, *Dichorhavirus* (família *Rhabdoviridae*), apresentam alta especificidade com seus vetores, supostamente devido à presença de receptores que facilitam sua entrada na célula por endocitose (WHITFIELD et al., 2005). Estudos com tospovírus relataram que uma glicoproteína (proteína G) seria a responsável por essas interações, sendo que esta se ligaria a um receptor celular do vetor e iniciaria uma fusão vírus-membrana do vetor (WHITFIELD et al., 2005; 2015; AMMAR et al., 2009). Entretanto, a forma de entrada no vetor ainda não foi totalmente esclarecida.

O tipo de interação CiLV-C-ácaro ainda é controverso. Roy et al. (2015) sugeriram que essa interação seria do tipo persistente propagativa, pois detectaram o RNA fita simples (ssRNA) do vírus em ácaros mantidos em fonte de inóculo. Contudo, estes resultados não foram validados e pode ser que tenha ocorrido um pareamento inespecífico dos iniciadores (*primers*), além do fato de que a reação de amplificação pode ter identificado o intermediário de replicação viral, pois o ácaro amostrado estava se alimentando das lesões no tecido vegetal. Com isso, é provável que a interação seja do tipo persistente circulativa, pois o vírus foi detectado em regiões extra-celulares (entre membranas de células do ceco e glândulas adjacentes do prossoma) e não dentro das células do ácaro vetor, além de não detectarem um viroplasma no interior das células (KITAJIMA; ALBERTI, 2014).

Experimentos biológicos de Tassi et al. (2017) sugeriram que a transmissão é circulativa, pois foi demonstrado um período reduzido de latência do vírus (sete horas), e os períodos de aquisição e inoculação foram avaliados em quatro e duas horas, respectivamente. Assim, outras informações prévias de experimentos biológicos, como a capacidade de larvas de *B. yothersi* transmitir CiLV-C, também dão suporte para hipótese de que a relação seja do tipo persistente circulativa (CHIAVEGATO, 1996).

Considerando que as estratégias de manejo e controle de doenças podem ser influenciadas pelo tipo de relação vírus-vetor, é essencial que todos os atores do patossistema leprose sejam investigados.

O atual manejo adotado para o controle do ácaro da leprose dos citros é feito basicamente pelo uso de acaricidas. Entretanto, alguns fatores podem dificultar o controle do ácaro no campo e contribuir para o seu aumento populacional, como o adensamento dos pomares; a mistura de outros produtos como inseticidas e fungicidas, que podem levar à diminuição da eficiência dos acaricidas; problemas de resistência devido à aplicação constante do mesmo ingrediente ativo, sendo que atualmente são utilizados basicamente dois produtos (espirodiclofeno e ciflumetofeno) (BASSANEZI, 2018). Com isso tem se buscado outras alternativas de manejo como a poda e remoção de plantas doentes, utilização de cercas vivas e controle de plantas invasoras como possíveis hospedeiras do ácaro vetor (BASSANEZI, 2004; BASTIANEL et al., 2006; 2010).

Considerando a relevância do patossistema leprose à citricultura, e ao pouco conhecimento sobre a interação ácaro-vírus, é pertinente avançar no estudo de genes relacionados a este processo, comparando o perfil de expressão gênica de ácaros com e sem o vírus da leprose (CiLV-C).

Neste cenário, tem grande importância o estudo de genômica funcional do ácaro *B. yothersi* em resposta à presença do CiLV-C, na expectativa de informações inéditas sobre mudanças funcionais, biológicas, e outras que possam contribuir para uma maior compreensão das interações envolvendo ácaro-vírus, uma vez que estudos tradicionais acerca de interação vírus-vetor envolvem questões biológicas e moleculares (ensaios de transmissão, técnicas moleculares como PCR convencional e quantitativo em tempo real). Adicionalmente, tais resultados podem agregar informações que, a médio-longo prazo, poderão auxiliar no desenvolvimento de estratégias viáveis e sustentáveis ao manejo da leprose em campo.

2.4. Genômica funcional - transcriptoma

Com o avanço dos estudos moleculares e desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento, diversas técnicas têm sido empregadas para estudos de genômica estrutural e funcional. Essas novas ferramentas são conhecidas como tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), e dentre eles se destacam as plataformas 454 FLX (Roche), SoliD (Applied Biosystems), MiSeq e HiSeq (Illumina) (FALEIRO; ANDRADE, 2011).

A genômica funcional pertence a um campo da biologia molecular que visa investigar a função específica dos genes e proteínas de um organismo, compreendendo o estudo das ômicas – transcriptômica (estudo da expressão gênica), proteômica (expressão proteica) e metabolômica (abundância de compostos químicos resultantes da expressão gênica), ao contrário da genômica estrutural que aborda aspectos genéticos e evolutivos (FALEIRO; ANDRADE, 2011). Estudos funcionais têm provido conhecimento acerca das interações moleculares entre vírus de plantas e seus insetos vetores (KAUR et al., 2016).

Com a análise do transcriptoma pode-se inferir sobre quando um gene é ativado ou inibido, pois, por meio de comparações entre os transcritos, é possível compreender mudanças celulares em resposta a determinadas situações, como variações ambientais, e investigar a funcionalidade dos genes (WANG et al., 2009; FALEIRO; ANDRADE, 2011). Uma das técnicas atualmente empregadas para estudos de expressão gênica de organismos é o sequenciamento de RNA (RNAseq), uma tecnologia rápida e muito usada no estudo de transcriptoma de eucariotos (WANG et al., 2009; ANDERS et al., 2013), incluindo artrópodes (LIU et al., 2011; PRICE et al., 2011). O sequenciamento permite uma diversidade de aplicações como estudos de *splicing* alternativo, descoberta de novos transcritos, edição de RNA, e permite inferências quanto à expressão dos genes envolvidos na interação praga-hospedeiro (ANDERS et al., 2013; WANG et al., 2016).

Para montagem do transcriptoma usando RNAseq, os fragmentos de RNA são convertidos em uma biblioteca de fragmentos de cDNA que são ligados a adaptadores em uma ou ambas as extremidades. Essas moléculas são amplificadas e sequenciadas obtendo sequências curtas de uma extremidade (*single-end*) ou ambas (*paired-end*). Os fragmentos gerados (denominados leituras – *reads*) podem ser alinhados de duas formas: em um genoma de referência ou usados para montagem *de novo* (sem referência). Contudo, um

alinhamento usando um genoma de referência tem maior acurácia, pois permite estimar o nível de expressão de cada gene encontrado (WANG et al., 2009).

Através da análise de transcriptoma, avançou-se nos estudos biológicos envolvendo insetos vetores de vírus como a mosca-branca *B. tabaci* (WANG; LIU, 2016). Esta pertence a um complexo de espécies distintas morfologicamente, com destaque para o biótipo B (Middle East-Asia Minor 1 – MEAM1), uma praga invasora global que acarreta danos a agricultura (LIU et al., 2007; XU et al., 2010) devido à transmissão de begomovirus como o tomato yellow leaf curl China virus (TYLCCNV). Nessa interação, *B. tabaci*-TYLCCNV, ambos precisam desenvolver estratégias para defesa própria, seja o inseto para se proteger de possíveis efeitos deletérios do vírus, o qual também precisa se proteger para aumentar a eficiência de transmissão (CZOSNEK et al., 2002).

Como não se conheciam os mecanismos moleculares envolvidos nessa específica interação vírus-vetor, Luan et al. (2011) utilizaram a plataforma Illumina para a montagem do transcriptoma de *B. tabaci* (MEAM1) em resposta ao TYLCCNV. Os autores relataram que a expressão de genes envolvidos no ciclo celular, metabolismo primário e resposta imune foi alterada em moscas-brancas virulíferas. Os genes envolvidos no metabolismo primário (metabolismo de lipídeo e aminoácido, tradução, ribossomo, espliceossoma) foram reprimidos pelo TYLCCNV. Em compensação, a resposta imune celular e humoral foi induzida, principalmente para os genes envolvidos na autofagia. Ensaaios de “Western blot” mostraram indução da autofagia no ovário e tecidos do corpo gorduroso de *B. tabaci*. Foi confirmado por PCR convencional que o TYLCCNV invade o sistema reprodutivo do inseto, sendo o DNA viral detectado no ovário de 80% de moscas-brancas 24 horas depois de se alimentarem de plantas de tabaco infectadas. Essa invasão já tinha sido relatada por Wang et al. (2010), que sugeriram que TYLCCNV pode ser transmitido horizontal e verticalmente, mas em baixa frequência. A ativação da autofagia é uma estratégia de proteção contra o vírus, pois ocorreu uma diminuição gradual do DNA viral presente no ovário (50%) após 120 horas.

Outro estudo possibilitado pelo sequenciamento de RNA foi o transcriptoma da glândula salivar de *B. tabaci* biótipo Q (Mediterranean - MED), sendo relatado que genes de metabolismo e transporte são enriquecidos na glândula primária (SU et al., 2012; WANG; LIU, 2016), importantes para compreender o processo alimentar do vetor, além de

informações acerca dos processos biológicos envolvidos na interação planta-vetor (SU et al., 2012).

O inseto *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), conhecido como tripses, também possui importância agrícola pelo fato de causar danos, tanto pela alimentação quanto pela transmissão de tospovírus, como o tomato spotted wilt virus (TSWV). A interação vírus-vetor é do tipo persistente propagativa, sendo que o vírus atravessa o corpo do inseto e replica em diferentes órgãos e tecidos até alcançar as glândulas salivares para finalizar sua transmissão na planta hospedeira (WHITFIELD et al., 2005). Devido a essa importância, Zhang et al. (2013) analisaram o transcriptoma do inseto vetor, juntamente com uma análise global da expressão gênica em resposta à infecção por TSWV. Por essa análise, foi observado que a infecção por TSWV leva à ativação de genes relacionados a endocitose, fagocitose e resposta imune celular e humoral. Os autores sugerem que genes de endocitose são essenciais para o transporte intracelular e intercelular das partículas virais, juntamente com genes relacionados à secreção salivar, o que beneficiaria a transmissão do TSWV para as plantas hospedeiras. Genes relacionadas à detoxificação e sítios-alvos a inseticidas (canal de sódio, acetilcolinesterases, receptor GABA, catalase) também foram induzidas em resposta ao vírus.

O primeiro Chelicerata a ter o genoma sequenciado foi o ácaro *Tetranychus urticae*. Através da análise de seu genoma, juntamente com o transcriptoma, foram encontrados genes relacionados à detoxificação e transporte de xenobióticos como peptidases, esterases e citocromo P450 (CYP), além de genes ligados a digestão, imunidade humoral, e produção de teia (GRBIC et al., 2011). Posteriormente, com o sequenciamento do genoma do ácaro predador *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae), foram identificados genes ligados a características biológicas fundamentais como determinação sexual, desenvolvimento e defesa imunológica (*serine protease*). Além destes, também foram identificados genes envolvidos na detecção e digestão de sua presa, o ácaro *T. urticae*, como as enzimas digestivas proteolíticas *trypsin-like*, *legumain* e *cathepsins* (JEYAPRAKASH; HOY, 2009; HOY et al., 2016).

Em um estudo recente, Bajda et al. (2015) compararam a expressão gênica diferencial entre populações de ácaros *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae) suscetíveis e resistentes ao acaricida espirodiclofeno, onde identificaram que genes envolvidos no processo de resistência e sítios-alvo utilizados em acaricidas, foram diferencialmente

expressos na população de ácaros resistentes ao espiroclorfenol. Os mesmos autores também realizaram uma análise filogenética com esses genes e, relataram que em *T. urticae* (Acari: Tetranychidae) os genes de detoxificação são mais numerosos.

A maior dificuldade para o controle de ácaros fitófagos é a resposta para resistência a acaricidas, uma vez que os artrópodes podem desenvolver dois tipos de mecanismos contra os compostos tóxicos: diminuir a exposição alterando a quantidade das enzimas de detoxificação e transportadoras; ou diminuir a sensibilidade, devido a mutações dos sítios-alvo, como os canais de sódio, acetilcolinesterases (AChE), receptor de GABA (ácido gama-aminobutírico) e citocromo b (cyt-b) (NIU et al., 2012; VAN LEEUWEN et al., 2014; BAJDA et al., 2015). Estudos de Bajda et al. (2015) demonstraram que a presença de mutações em acetilcolinesterases, uma das principais enzimas de detoxificação, conferiram resistência de ácaros praga a organofosforados. Contudo, estes ácaros que tiveram o genoma e/ou transcriptoma analisado, e tampouco são vetores de fitovírus.

Estudos sobre o desenvolvimento e a base genética do ácaro *B. yothersi* são escassos e pouco se conhece sobre sua interação direta com o CiLV-C. Todavia, trabalhos desenvolvidos no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” (CCSM – IAC) acerca da interação do vírus-vetor-planta sugerem a presença de genes candidatos a efetores que desencadeariam o reconhecimento do ácaro pela planta.

De acordo com Arena et al. (2016), possíveis efetores presentes na saliva de *B. yothersi* seriam reconhecidos pela planta durante a alimentação, culminando na ativação das vias de defesa contra herbivoria [ácido jasmônico (JA) e etileno(ET)]. Quando ácaros *B. yothersi* estão virulíferos para o CiLV-C, a presença das partículas virais no mesófilo celular desencadearia uma cascata de sinalização de defesa contra patógenos biotróficos (via de ácido salicílico - SA) e mecanismos de silenciamento de RNA, intensificando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e morte celular ao redor do tecido infectado. A ativação da via SA e silenciamento de RNA acarretaria na inibição das vias JA/ET (ARENA et al., 2016).

Por meio de um consórcio entre pesquisadores do Brasil (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Mandioca e Fruticultura e Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” – IAC) e da Bélgica (Ghent University), o genoma de *B. yothersi* se encontra em fase final de anotação, disponível em banco de dados protegido e acessível por nosso grupo (ORCAE - Online Resource for Community Annotation of Eukaryotes) (STERCK et al., 2012). Graças ao uso deste banco de dados foi possível mapear sequências obtidas via

transcriptoma, identificando genes de potencial interesse aos estudos do complexo patossistema leprose.

Os benefícios resultantes da pesquisa em genomas e transcriptomas para o manejo de pragas são diversos e, particularmente, para o patossistema leprose podem representar suporte técnico para enfrentar algumas ameaças e desafios, como por exemplo, resistência e/ou resposta a pesticidas, relação com hospedeiros, desenvolvimento de ferramentas para silenciamento gênico, e identificação de componentes moleculares que possam estar envolvidos nesta singular interação vírus-vetor.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar o perfil do transcriptoma do ácaro *Brevipalpus yothersi*, comparando e identificando genes diferencialmente expressos entre populações virulíferas e avirulíferas para o CiLV-C.

3.2. Objetivos Específicos

Estabelecer os perfis de expressão gênica de populações contrastantes de *B. yothersi* (avirulíferas x virulíferas);

Identificar, selecionar e validar genes com potencial envolvimento na interação vírus-vetor.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material biológico

Para a realização deste estudo foram utilizados ácaros *B. yothersi* de uma população isolinha (originada de uma única fêmea), proveniente de Cruz das Almas – BA, estabelecida em 2008 e mantida em sala climatizada com controle de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa (70% a 80%), no laboratório de Acarologia do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” (CCSM - IAC), em Cordeirópolis/SP.

Os ácaros foram mantidos e multiplicados em frutos cítricos que compunham três diferentes tratamentos (Figura 4): (1) frutos de laranja doce (*Citrus sinensis*) com sintomas de leprose (carregando o CiLV-C, estirpe SJP, RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016), para a multiplicação de ácaros virulíferos; (2) frutos de laranja doce sadios (isentos do CiLV-C), para criação de ácaros avirulíferos; (3) frutos de lima ácida Tahiti (*C. latifolia*) para criação da população controle (ácaros avirulíferos), uma vez que limões e limas são resistentes a infecção por CiLV-C (BASTIANEL et al., 2010).

Figura 4. Frutos cítricos para multiplicação das populações de ácaros avirulíferos e virulíferos: (A) laranja doce sadia (sem vírus), (B) laranja doce com o CiLV-C e (C) lima ácida Tahiti, variedade resistente ao CiLV-C.

Os frutos foram coletados em pomares orgânicos e trocados a cada 15 dias, garantindo a multiplicação das populações estabelecidas nos diferentes tratamentos. A manutenção dos frutos foi realizada de acordo com a metodologia descrita em Rodrigues et al. (2007), tendo sido lavados, secos e parafinados, deixando uma área livre para criação, a qual foi circulada com cola entomológica BioStop (Biocontrol, Indaiatuba, Brasil). Na área central livre foi pincelada uma mistura de farinha de trigo, areia, gesso e água, simulando lesões de verrugose usadas como abrigo e favorecendo a reprodução dos ácaros.

4.2. Extração de RNA total de ácaros *B. yothersi*

O RNA total foi extraído com “RNAqueous® Micro kit” (Ambion, Life Technologies) seguindo protocolo adaptado (SANTOS et al., 2015), sendo o mais eficiente para extração de RNA de ácaros *Brevipalpus* spp. Os ácaros foram coletados dos frutos de criação, utilizando pincel de pelo único, e transferidos para microtubos de 1,5 mL. Para cada tratamento estabelecido foram obtidas quatro repetições com 500 ácaros por microtubo.

Os ácaros foram macerados com auxílio de um bastão de vidro e, na sequência, foram adicionados 100 µL de tampão de lise e 50 µL de etanol 100%. A solução foi misturada em vortex, transferida para uma coluna de filtragem e centrifugada a 18.620 x *g* por 10 segundos. Após esse procedimento, foram adicionados 180 µL de solução de lavagem 1 e a coluna centrifugada a 18.620 x *g* por 10 segundos. O conteúdo do tubo foi descartado e, em seguida, foram adicionados 180 µL de solução de lavagem 2/3. A solução foi centrifugada a 18.620 x *g* por 10 segundos. Novamente o conteúdo do tubo foi descartado e a lavagem anterior repetida. Em seguida, o tubo coletor foi descartado e a coluna de filtragem transferida para um novo tubo e centrifugada a 21.380 x *g* por um minuto, para retirada de resíduos e completa secagem. As colunas foram transferidas para tubos de 1,5 mL e foram adicionados 10 µL de solução de eluição (aquecida a 75°C). Os tubos foram centrifugados a 21.380 x *g* por 30 segundos e, em seguida, foram adicionados mais 10 µL da solução de eluição, seguido de nova centrifugação a 21.380 x *g* por 30 segundos.

Após eluição, foram adicionados 2 µL de “10X DNase I Buffer” e 1 µL de “DNase I”. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 20 minutos. Posteriormente, 2 µL da solução “DNase Inactivation Reagent” foram adicionados e as amostras incubadas em temperatura ambiente por 2 minutos. Uma nova centrifugação a 21.380 x *g* foi realizada por 90 segundos e o sobrenadante transferido para tubos de 1,5 mL. O RNA foi verificado quanto à sua concentração e qualidade via espectrofotômetro (NanoDrop 8000 – Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) e armazenado em ultrafreezer a -80°C.

4.3. Detecção de CiLV-C: síntese de cDNA e RT-PCR

Uma alíquota do RNA (2 µL) extraído de *B. yothersi* foi utilizada para detecção molecular do CiLV-C, confirmando o status de cada tratamento por meio de *primers* específicos para a região da proteína de movimento de CiLV-C SJP (*mp-F*:

GCGTATTGGCGTTGGATTCTGAC; *mp*-R: TGTATACCAAGCCGCCTGTGAACT) descritos por Locali et al. (2003). A reação de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems), com um volume final de 20 µL contendo: 2 µL de tampão 10X, 0,8 µL de dNTP (10 mM), 2 µL de *primers* randômicos, 1 µL de enzima transcriptase reversa, 1 µL de inibidor de RNase e água para completar o volume. As condições da reação foram de 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos.

Em seguida foi realizada a PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando kit “GoTaq® Master Mix” (Promega), de acordo com protocolo do fabricante, e as condições de amplificação conforme descrito em Locali et al. (2003): 94°C por 2 minutos, 32 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos da reação foram aplicados em gel de agarose (0,8%), corados com brometo de etídeo (0,5%), visualizados em luz ultravioleta (UV) e a imagem capturada em fotodocumentador (GE Healthcare).

4.4. Sequenciamento de RNA e análise da expressão gênica

Após verificação da qualidade e concentração do RNA de *B. yothersi* em espectrofotômetro, as amostras foram enviadas para o Laboratório de Biotecnologia Animal, do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, Piracicaba – SP. A análise da estimativa de integridade das amostras de RNA (RIN – RNA integrity number) foi realizada em equipamento Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) e visa identificar a presença ou ausência de produtos degradados. Passando-se essa fase, prosseguiu-se com as etapas para o sequenciamento de RNA (RNAseq).

As bibliotecas de cDNA foram preparadas usando “Illumina TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit” (Illumina, San Diego, USA), o qual utiliza oligodT para enriquecimento da proporção de mRNA, eliminando a maior parte de RNA ribossomal. O sequenciamento foi realizado utilizando “HiSeq SBS v4 High Output kit” (Illumina, San Diego, USA) em sistema Illumina HiSeq 2500.

Após o sequenciamento, os adaptadores foram removidos pelo software Real Time Analysis 1.13 (Illumina, San Diego, USA) e foram geradas leituras pareadas de 125 pb (2x125)

para cada amostra. Em seguida, foi realizada a análise de qualidade das sequências utilizando o software FastQC.

Os dados gerados foram analisados de acordo com o protocolo estabelecido por Anders et al. (2013), baseado em linguagem R e pacotes do software Bioconductor (GENTLEMAN et al., 2004). Foi realizado o mapeamento dos *reads* no genoma de *B. yothersi*, utilizando o TopHat2 (KIM et al., 2013) e, a partir dos dados de alinhamento, foi feita a contagem dos *reads* mapeados por gene utilizando o HTSeq (ANDERS et al., 2015). A análise de expressão gênica diferencial foi realizada através do DESeq2 (Figura 5), implementado com base no modelo de distribuição binomial negativa (ANDERS; HUBER, 2010).

Figura 5. Pipeline da montagem do transcriptoma de *B. yothersi* em RNAseq. Após construção da biblioteca de cDNA, o sequenciamento foi realizado em plataforma Illumina HiSeq 2500, gerando leituras pareadas de 125 pb para cada amostra. Após uma análise de qualidade em programa FastQC, os *reads* foram alinhadas ao genoma de *B. yothersi* e realizada análise de expressão diferencial.

Em seguida foram realizadas análises funcionais dos genes diferencialmente expressos (GDE), utilizando o programa Blast2GO (GÖTZ et al., 2008). Foi feita, ainda, uma busca por proteínas similares em outros artrópodes através da comparação com o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando a ferramenta BLASTX.

4.5. Validação da expressão gênica diferencial

4.5.1. Seleção de genes e validação de *primers* por RT-PCR

Os genes identificados como diferencialmente expressos (DEGs) e que, com base em busca na literatura, apresentaram potencial envolvimento na interação *B. yothersi*-CiLV-C foram selecionados para validação da expressão diferencial por RT-qPCR (Real Time – Quantitative PCR).

Os *primers* foram desenhados no programa “Primer Quest Tool” (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, USA) com base nas sequências codificantes (CDS – coding DNA sequence) do genoma de *B. yothersi*, sintetizados e validados via amplificação por PCR convencional, utilizando kit comercial “GoTaq® Colorless Master Mix 2X” (Promega). As condições de amplificação foram: um ciclo de 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 20 segundos, e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos da PCR amplificados foram utilizados para sequenciamento direto usando sistema BigDye® Terminator Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific), em sequenciador ABI Prism 3730 (Applied Biosystems, CA, USA). Para cada reação foi utilizado 0,5 µL do *primer* específico, 0,4 µL de BigDye, 2 µL de tampão SM (*save money*) e 2 µL do produto de PCR, completando o volume final de 10 µL com água estéril. O ciclo da reação foi de 96°C por 2 minutos, 25 ciclos de 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após sequenciamento automático, os eletroferogramas obtidos foram analisados em programa CLC Genomics Workbench, onde foi realizada a montagem dos *contigs* e obtidas as sequências consenso de cada gene selecionado. Essas sequências foram comparadas com

as sequências CDS originais, através da ferramenta BLASTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmação de sua identidade.

4.5.2. Validação da expressão gênica por RT-qPCR

Em uma nova coleta de ácaros *B. yothersi* avirulíferos e virulíferos para CiLV-C foi realizada para análise da expressão gênica em RT-qPCR, com três réplicas biológicas com 200 ácaros cada.

O RNA extraído (conforme item 4.2) foi utilizado na síntese de cDNA utilizando kit comercial “Platus Transcriber RNase H – cDNA First Strand kit” (Sinapse Inc), seguindo as instruções do fabricante, sendo que para cada amostra foi utilizado 200 ng de RNA (em uma reação de 20 µL). O cDNA obtido foi diluído na proporção 1:40 e a RT-qPCR foi realizada utilizando “GoTaq® qPCR Master Mix” (Promega) em equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies), com volume por poço da placa de 12 µL contendo 1,5 µL de água, 6,5 µL de GoTaq, 0,5 µL de cada *primer* (10 mM) e 3 µL de cDNA diluído.

As condições de amplificação foram de 3 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos, com extensão de 72°C por 30 segundos. Foi realizada uma curva de dissociação (55°C por 10 segundos, e 0,5°C por 10 segundos até alcançar 95°C) para verificar possíveis contaminações e reações inespecíficas. As reações para cada par de *primers* foram realizadas em triplicatas, incluindo os controles (reações sem cDNA). Os genes *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) e *alpha-Tubulin* (α Tub) foram usados como genes de referência (ROGERIO et al., 2017).

Os dados de expressão diferencial foram comparados com os perfis de expressão de ácaros virulíferos e avirulíferos em RT-qPCR. Para cada gene foi calculado um único valor de eficiência, dado pelo valor médio de todas as reações. Para cada uma das três repetições biológicas foi calculado um único valor de CT, dado pela média dos valores das três réplicas técnicas, usando software Real-Time PCR Miner (ZHAO; FERNALD, 2005).

Os resultados foram analisados por um método derivado do $2^{-\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) permitindo a normalização com os genes de referência. Os valores de CT foram transformados em quantidades relativas através da função $Q = E^{\Delta CT}$, sendo atribuído o valor de 1 para amostra com maior nível de expressão. Na função, Q corresponde à quantidade relativa à amostra com maior expressão (menor CT), E é a

eficiência de amplificação e ΔCT a diferença entre o menor CT e o CT da amostra em análise. Os valores de *foldchange* (FC) foram calculados para cada gene do tratamento com ácaros virulíferos em relação ao controle (ácaros avirulíferos).

A análise estatística foi realizada usando teste T (*one-way ANOVA*) para comparar as médias de expressão de cada gene entre os dois tratamentos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração de RNA total de ácaros *B. yothersi*

Após a extração do RNA total, as amostras foram selecionadas de acordo com os parâmetros de concentração e qualidade (Tabela 1). As amostras consideradas com boa qualidade apresentaram relação de absorbância $A_{260/280}$ dentro do esperado (1,8 - 2,2), valor de integridade próximo ao valor médio (RIN = 8) e padrão eletroforético sem traços de degradação. Apesar de algumas amostras do tratamento com ácaros em lima ácida Tahiti apresentarem um RIN abaixo do mínimo (RIN = 5), foram aprovadas para sequenciamento.

Tabela 1. Concentração e qualidade das amostras de RNA selecionadas para sequenciamento.

Amostra	Tratamento*	Concentração (ng/μL)	$A_{260/280}$	RIN
01	AV-La	87,02	2,05	6,1
02	AV-La	72,43	2,00	6,3
03	AV-La	87,73	2,02	6,9
04	AV-La	59,5	2,13	6,8
05	V-La	54,58	2,04	5,6
06	V-La	58,39	2,05	5,5
07	V-La	83,22	2,00	6,9
08	V-La	74,89	2,06	7
09	AV-Li	52,08	2,07	3,8
10	AV-Li	49,42	2,05	4,2
11	AV-Li	33,01	1,97	5
12	AV-Li	99,28	2,5	6

*(AV-La) avirulífero em laranja; (V-La) virulífero em laranja; (AV-Li) avirulífero em lima ácida Tahiti.

5.2. Detecção de CiLV-C: síntese de cDNA e PCR

A detecção molecular, via RT-PCR, utilizando *primers* que amplificam uma região do gene *mp* de CiLV-C confirmou que as amostras de ácaros avirulíferos (mantidos em laranja doce e lima ácida) estavam negativas (Figura 6A-C) para o vírus da leprose dos citros. As amostras de ácaros virulíferos apresentaram os fragmentos esperados (339 pb) (Figura 6B), confirmando o status de positivo para CiLV-C.

Figura 6. Gel de agarose (0,8%) da RT-PCR para os ácaros avirulíferos (A) e virulíferos (B) mantidos em laranja doce, e ácaros avirulíferos (C) mantidos em lima ácida Tahiti: (L) marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Scientific); (1-4) amostras de ácaros *B. yothersi*; (5) controle cDNA (água); (6) controle RT-PCR (água); (7) controle positivo CiLV-C.

5.3. Sequenciamento de RNA e análise de qualidade

Todas as amostras foram sequenciadas em uma única corrida (*lane*), visando eliminar efeitos de variação na comparação entre amostras dos diferentes tratamentos [ácaros avirulíferos em laranja (AV-La), ácaros virulíferos em laranja (V-La), ácaros avirulíferos em lima ácida Tahiti (AV-Li)].

No total, foram obtidos 488 milhões de *paired-end reads*, com uma média de 40 milhões de *reads* por amostra (Figura 7). Em geral, para experimentos cujo propósito é comparar o transcriptoma de amostras enriquecidas em mRNA, recomenda-se em torno de 30 milhões de *paired-end reads* por amostra. Portanto, o valor obtido no sequenciamento foi adequado para a continuidade das análises.

Figura 7. Número de *paired-end reads* gerados para cada tratamento. O valor de cada barra corresponde à média do número de *paired-end reads* das réplicas de um mesmo tratamento. (AV-La) ácaros avirulíferos da laranja, (AV-Li) ácaros avirulíferos da lima, (V-La) ácaros virulíferos da laranja.

Todas as amostras apresentaram boa qualidade de *reads* (Figura 8), com valores médios de qualidade de bases acima de 30 (indicativo de alta qualidade de bases). Algumas amostras apresentaram contaminação por adaptadores, os quais foram removidos utilizando o programa Trimomatic (BOLGER et al., 2014).

Figura 8. Perfil de qualidade dos *reads* das amostras do experimento, conforme avaliado pelo FastQC. O gráfico mostra um valor de qualidade (eixo y) para todas as bases em cada uma das posições do read (eixo x). A linha azul representa a qualidade média. Valores maiores indicam maior qualidade e, desta forma, o gráfico é dividido em três áreas: verde (boa qualidade), laranja (qualidade razoável) e vermelho (baixa qualidade).

5.4. Análise da expressão gênica diferencial

Os *reads* sequenciados foram mapeados e alinhados no genoma de *B. yotheri* (72,2 Mb) que, mesmo em fase de finalização da anotação, está acessível ao nosso grupo de trabalho.

O *reads* dos ácaros avirulíferos e virulíferos (mantidos em laranja) obtiveram uma média de alinhamento no genoma de 91,5% e 72,25%, respectivamente (Figura 9). As amostras V-La2 e V-La4, do tratamento com ácaros virulíferos, apresentaram uma menor porcentagem de *reads* alinhados ao genoma do ácaro (47,9% e 55,4%, respectivamente), o que pode ser devido a uma maior quantidade de *reads* referentes ao genoma do CiLV-C.

Entretanto, os *reads* correspondentes aos ácaros avirulíferos (mantidos em lima Tahiti) não apresentaram alinhamento satisfatório (média de 37,3%), sendo que as amostras AV-Li2 e AV-Li4 tiveram 54,9% e 88,4% de seus *reads* alinhados ao genoma de *B. yotheri*, respectivamente. Contudo, as demais amostras (AV-Li1 e AV-Li3) apresentaram uma baixa porcentagem de *reads* alinhados ao genoma do ácaro, além da presença de ruídos. Em função disto, as análises de expressão gênica diferencial tiveram continuidade apenas com os tratamentos contrastantes em laranja doce (ácaros avirulíferos e virulíferos).

Figura 9. Alinhamento dos *reads* no genoma de referência de *B. yothersi*. (AV-La) ácaros avirulíferos e (V-La) virulíferos da lanraja, (AV-Li) ácaros avirulíferos da lima.

Nesta primeira avaliação, foram obtidos 841 genes diferencialmente expressos (GDE), dos quais 711 genes foram induzidos em ácaros virulíferos em comparação ao tratamento avirulífero, [foldchange (Log_2FC) > 0.5, p-value ajustado (padj) > 0.05], e 130 genes reprimidos (Log_2FC < 0.5, padj > 0.05) (Figura 10).

Figura 10. Resumo do teste de expressão diferencial com os valores de Log_2FC (eixo x) e padj (eixo y) para cada gene. Cada ponto corresponde a um gene, sendo os coloridos os genes diferencialmente expressos (GDE). Genes induzidos em ácaros virulíferos em vermelho, e genes reprimidos em verde. As linhas que cortam o gráfico separam os genes considerados diferencialmente expressos.

Analisando o *heatmap* gerado pela análise de expressão diferencial (Figura 11) em DESeq2, que representa o perfil geral da expressão gênica de todas as amostras e como elas se agrupam, podemos observar que duas réplicas do tratamento virulífero (V1 e V3)

apresentaram um perfil de expressão similar às réplicas do tratamento avirulífero, o que também foi notório na análise dos componentes principais (PCA) (Figura 12), onde as duas réplicas estavam agrupadas próximas ao grupo avirulífero.

Figura 11. Clusterização hierárquica das amostras virulíferas e avirulíferas, de acordo com o padrão de expressão gênica. As linhas correspondem aos genes e as colunas às amostras. As cores e sua intensidade mostram o nível da expressão de determinado gene ao longo das amostras. A coloração vermelha representa os genes induzidos, a verde os genes reprimidos e a preta representa genes com expressão inalterada.

Figura 12. Análise de componentes principais (PCA), mostrando o agrupamento das amostras sequenciadas em grupos (pontos rosas: ácaros virulíferos; pontos azuis: ácaros avirulíferos). O componente principal (PC) 1 apresenta uma variação de 70%, o que se deve pela diferença no status de cada grupo (avirulífero e virulífero). A variação em PC 2 é menor (14%), devido à variação entre as réplicas biológicas.

Com isso, foi realizado um alinhamento dos *reads* sequenciados no genoma de CiLV-C (acesso GenBank: RNA-1 DQ352194/RNA-2 DQ352195) e observado que estas amostras apresentavam baixa concentração de vírus (Figura 13). Possivelmente, nestas amostras coletadas aleatoriamente, nem todos os ácaros teriam se alimentado dos tecidos infectados nos frutos, pois como observado anteriormente na figura 9, foram as amostras com maior porcentagem de alinhamento no genoma de *B. yothersi* (90,8% e 89,1%, respectivamente).

Figura 13. Alinhamento dos *reads* no genoma de CiLV-C: (AVL a) ácaros avirulíferos e (V) virulíferos da laranja.

Essa variação na concentração do vírus em seu vetor não é inesperada, tendo sido também observada em estudos de Kruse et al. (2017), cuja análise de expressão gênica de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), vetor do agente causal da principal doença que acomete pomares de citros no mundo, o *Huanglongbing* (HLB) (HALBERT; MANJUNATH, 2004), observaram uma variação nas amostras positivas para *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), inferindo que nem todos os insetos expostos à bactéria foram infectados. No caso de *B. yothersi*, Tassi et al. (2017) observaram que a porcentagem de ácaros virulíferos colonizando, constantemente, tecidos infectados apresentou uma variação de 25-60%.

Assim sendo, foi feita uma nova análise de expressão diferencial e, excluindo as amostras com baixo título viral (V1 e V3), foram obtidos 5.690 genes diferencialmente expressos (2.736 induzidos e 2.954 reprimidos) (Figura 14). Podemos inferir que as amostras V1 e V3 estavam, provavelmente, mascarando a diferença entre os tratamentos, como pode ser observado no perfil de expressão diferencial (Figura 15). Com essa nova análise, foi observada uma padronização e agrupamento entre os tratamentos, confirmado pela análise

de PCA, com uma variação de 89% entre os tratamentos, e 5% de variação entre as réplicas biológicas (Figura 16).

Figura 14. Resumo do teste de expressão diferencial, apresentando os valores de Log2FC (eixo x) e padj para cada gene. Cada ponto corresponde a um gene, sendo os coloridos os genes diferencialmente expressos (GDE). Genes induzidos em ácaros virulíferos em vermelhos, e genes reprimidos em verde. As linhas que cortam o gráfico separam os genes considerados diferencialmente expressos.

Figura 15. Clusterização hierárquica das amostras virulíferas e avirulíferas, de acordo com o padrão de expressão gênica. As linhas correspondem aos genes e as colunas às amostras. As cores e sua intensidade mostram o nível da expressão de determinado gene ao longo das amostras. A coloração vermelha representa os genes induzidos, a verde os genes reprimidos e a preta representa expressão inalterada.

Figura 16. Análise de componentes principais (PCA), mostrando o agrupamento das amostras sequenciadas em grupos (pontos rosas: ácaros virulíferos; pontos azuis: ácaros avirulíferos). O PC 1 apresenta uma variação de 89%, o que se deve pela diferença no status de cada grupo (avirulífero e virulífero). A variação em PC 2 é menor (5%), devido a variação entre as réplicas.

5.5. Análise funcional

Através do programa Blast2GO foi realizada a análise funcional dos GDE, buscando proteínas putativas similares em outros artrópodes no banco de dados do NCBI, por meio da ferramenta BLASTX. Os genes foram distribuídos em categorias funcionais como componentes celulares, funções moleculares e processos biológicos (Figura 17) (CONESA et al., 2005).

Os processos biológicos mais representados foram processos celulares (1.775 genes) e metabólicos (1.706 genes). No componente celular, a maioria dos genes se enquadraram como específicos de célula (1.142 genes), parte da célula (1.132 genes), membrana (1.054 genes), parte da membrana (802 genes) e organelas (730 genes). As funções moleculares incluíram atividade catalítica (1.552 genes) e ligação (2.255 genes). A caracterização funcional de *B. yothersi* foi semelhante com distribuição encontrada por Bajda et al. (2015), tendo sido atribuída anotação funcional para os 5.833 genes de *P. ulmi*, outro ácaro polífago.

Figura 17. Caracterização de GDE em ácaros *B. yotheresi* em resposta a infecção por CiLV-C. Todos os genes foram classificados nas categorias funcionais: (A) processos biológicos, (B) compostos celulares e (C) funções moleculares, em Blast2GO (nível 2).

Esta análise geral evidencia as categorias às quais os genes diferencialmente expressos se enquadram, mas não correspondem às vias e/ou categorias mais expressas. Por isso a necessidade de uma análise de enriquecimento de vias (GSEA – Gene Set Enrichment Analysis) para identificar processos biológicos enriquecidos (super-representados) na lista de genes diferencialmente expressos (MOOTHA et al., 2003; SUBRAMANIAN et al., 2005). Entretanto, em função de o genoma do ácaro *B. yotheresi* não estar completamente anotado, ainda não foi possível a realização desta análise.

5.6. Validação da expressão gênica diferencial (RNAseq)

5.6.1. Seleção de genes e validação de primers por RT-PCR

Genes relacionados ao processo de detoxificação, atividade antiviral e resposta ao estresse, imunidade, digestão, metabolismo primário, além de possível envolvimento na interação vírus-vetor, foram diferencialmente expressos em resposta ao CiLV-C.

Os *primers* foram desenhados, sintetizados e validados por RT-PCR, utilizando RNA de ácaros avirulíferos para CiLV-C, para verificar sua funcionalidade (Figura 18), contudo, a validação dos genes de detoxificação só foi possível mediante utilização de RNA de ácaro virulífero (Figura 19). Os produtos da PCR que apresentaram fragmentos únicos foram sequenciados e tiveram sua identidade confirmada, e utilizados para validação da expressão gênica em RT-qPCR. Destes, 23 genes foram selecionados para validação da expressão gênica (Tabela 2).

Figura 18. Gel agarose 2% representado a validação por RT-PCR dos *primers* para os genes selecionados. (L) marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Scientific), (C-) reação sem cDNA. Transcritos selecionados: (1) *BTB/POZ domain*, (2) *zinc finger*, (3) *heat shock 71 kD*, (4) *vigilin-like*, (5) *cathepsin B-like*, (6) *trypsin-1-like*, (7) *c-Jun-N-terminal kinase protein*, (8) *pancreatic lipase-related protein*, (9) *cytochrome b ascorbate-dependent protein*, (10) *acetyl-coA acetyltransferase*, (11) *low-density lipoprotein receptor*, (12) *piwi-like protein*, (13) *28S ribosomal protein*, (14) *G protein-coupled receptor kinase-2 like*, (15) *kinesin-like protein*, (16) *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase*, (17) *cathepsin L1*, (18) *legumain*, (19) *aquaporin*, (20) *chitin synthase*, (21) *propable chitinase 3*, (22) *vitellogenin-like*, (23) *protein kinase C*, (24) *histone-lysine N-methyltransferase*.

Figura 19. Gel agarose 2% representando a validação por RT-PCR dos *primers* para os genes selecionados. Reação realizada com *primers* referentes aos genes de detoxificação: (1) *Cytochrome P450 3A18*, (2) *ABC transporter G family*, (3) *Acetylcholinesterase*, (4) *UDP-glucosyltransferase* e (5) *Glutathione S-transferase Mu-like*, a partir de cDNA de ácaros *B. yothersi* virulíferos. (L) marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Scientific), (C-) reação sem cDNA.

Tabela 2. Genes diferencialmente expressos em *B. yothersi* avirulíferos em comparação aos virulíferos, selecionados para validação da expressão gênica em RT-qPCR. Sequências *forward* (F) e *reverse* (R) dos *primers*, tamanho do amplicon (A) esperado e função dos genes.

Gene	Sequências (5'-3')	A (pb)	Função
ABC transporter G family	F: TGTACCATGGATGGGAAATGTAA R: CACACTGGGAAACTCCGAAA	142	Detoxificação
Acetylcholinesterase	F: CGCTTCCTCGGTATTCCTTATG R: ACCGATAATCTTGGTTGGTAGC	137	Catálise e hidrólise
Acetyl-CoA acetyltransferase	F: GCCATCCACTCGGAATGTC R: CCATTACAGGCACTCGCTAAA	94	Detoxificação
Cytochrome P450 3A18	F: GAGACGATTCCAACGCTTCA R: AGAATGTTCCACCATACTGTTCA	140	Detoxificação
Catalase	F: AGATCATTGAGTGTGGTGAAA R: AAAGGTGTGCGAGTGATAGG	107	Processo de oxidação-redução
Cathepsin B	F: ACACCATGGAGTTAGTTGCTATC R: GCAGATTGAACGGGACTGTAA	87	Protease digestiva
Cathepsin L1	F: GGTGTTGATACGGAACCTCTTA R: TTGTGCCACATTTGCTTTAC	79	Protease digestiva
Chitinase 3	F: ACAGAAACGTACCGGCATAG R: TCCTCAGCATCCTCATCTATCT	91	Hidrólise de quitina
Cytochrome b ascorbate 3	F: CATGGTTGCGATGACTTACCT R: GTCAGGATTGAGAGTCCATGAAATA	120	Componente de membrana
c-Jun-amino-terminal kinase protein 4	F: AGCGTGCGTCTTTGAGAA R: ATCAGCAGACATACAGACTTCC	133	Regulação endocítica
Glutathione S-transferase Mu-like	F: GGTGACCTCAAGATCACTCAAG R: CATTGCCACATAGTTTCCATTCC	137	Detoxificação

Tabela 2. (continuação) Genes diferencialmente expressos em *B. yothersi* avirulíferos em comparação aos virulíferos, selecionados para validação da expressão gênica em RT-qPCR. Sequências *forward* (F) e *reverse* (R) dos *primers*, tamanho do amplicon (A) esperado e função dos genes.

Gene	Sequências (5'-3')	A (pb)	Função
G protein-coupled receptor kinase 2	F: GCAAGAGAAGGAGGATCAGATAG R: GTCCAATGGGTTGTGATTCTATG	148	Tradução de sinal
Heat shock 71 kDa protein	F: GCTTCAACCTCAAGCAAACC R: CCTCATCCACCTTATCCAGAAC	93	Processamento antigênico
Histone-lysine N-methyltransferase	F: CCAAGAGAGTTCAAGCAGAGAG R: ACGGTGGCATCGATGATTT	101	Metabolismo de aminoácido
Legumain	F: ATGCAGTGAAAGAGTGGATAGG R: CCTGAAGTTTCGGTCTCTCTTC	95	Protease digestiva
Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	F: ACTGTGAATACGGTGAAGATGAG R: CATCTCCGGCTGGACAATC	141	Receptor de lipoproteínas
Pancreatic lipase-related protein 2-like	F: GTCGAATATCAGCTCTCGATGG R: CACCTCCACTGGTGTGTATG	108	Metabolismo de lipídeos
Protein Kinase C	F: AAAGCAAGCTTACACTTGGAAAG R: GGTGGACAAAGATCCTGGAAT	146	Sinalização e regulação celular
Serine protease	F: CTACTCGTCTAGATTGTGGTCTTG R: TGTGAGCCAACCAAGGATATT	93	Imunidade humoral
Trypsin-1	F: TGCAATCAGACGCTGAATCT R: CCTCCAACAATTCGGCATTC	103	Protease digestiva
UDP-glucosyltransferase	F: CGAAATTGTCCTGAAAGATGAAGT R: GGTTTCAACGAACCTCTCGATTT	118	Detoxificação
Zinc Finger	F: ATGGATTTAGCCGCTTCTACC R: GCACTCGCAGTCGTTCA	106	Regulação transcricional
28S ribosomal protein	F: TTTAGACCGGATGGAAGGATTG R: GGCCATATAGAGGTGGAAATG	102	Tradução – ribossomo

5.6.2. Validação por RT-qPCR

Na análise gênica diferencial de *B. yothersi*, foram encontrados genes com potencial envolvimento na interação vírus-vetor (Figura 20). Dentre eles, o gene *c-Jun-N-terminal*

kinase protein 4 (JNK-4) foi induzido em resposta ao CiLV-C. Estudos de Wang et al. (2017) demonstraram que o tenuivírus rice stripe virus (RSV) manipula o seu inseto vetor *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) para produzir a proteína TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) e produzir em menor quantidade a proteína GPS2 (*G protein pathway suppressor 2*), uma supressora da via de sinalização JNK. Os autores observaram que RSV se liga à proteína GPS2, impedindo que esta iniba a ativação da enzima JNK-4. Quando esta via é ativada, as partículas virais atravessam o corpo do vetor por endocitose e ocorre a replicação RSV. Como o gene que codifica essa mesma proteína foi diferencialmente expresso em ácaros virulíferos, e também pelo fato de ser uma via responsável pela regulação de endocitose e fagocitose, optou-se por validá-lo em qPCR, apesar do CiLV-C provavelmente não replicar no ácaro vetor.

Outro gene diferencialmente expresso em *B. yothersi* virulífero foi *protein kinase C* (PKC), a qual está envolvida na sinalização molecular e regulação de processos celulares principalmente aqueles envolvidos na barreira epitelial do intestino de insetos. Pakpour et al. (2013) identificaram e caracterizaram seis genes que pertencem a essa família de kinases, que foram expressos no epitélio do intestino de mosquitos do gênero *Anopheles*. Os mesmos observaram que a inibição da PKC aumentou a integridade da barreira física do intestino, afetando negativamente o desenvolvimento do protozoário *Plasmodium falciparum* dentro do vetor, sugerindo que a sua inibição seria uma boa estratégia para controle da infecção deste parasita. Entretanto, na análise da expressão em qPCR, esse gene não apresentou diferença significativa no material de ácaro virulífero em relação ao controle (ácaro avirulífero), assim como a proteína *G protein-coupled receptor kinase-2* (GPCR), proteína de membrana envolvida em diversos processos fisiológicos como crescimento, desenvolvimento e reprodução de insetos, além da atuação na tradução de sinais, onde ocorre a transformação de sinais extracelulares em intracelulares (LI et al., 2013).

As lipoproteínas representam uma super-família de genes que atuam como receptores de endocitose, mediando a absorção de lipídeos da hemonlinfa e nutrientes do intestino (WILLNOW, 1999). Por auxiliarem no transporte de fluídos pelo corpo dos insetos, têm sido relacionadas a estudos de interação vírus-vetor, pois poderiam auxiliar no transporte viral. Dentre eles, na análise de expressão diferencial, o receptor de lipoproteína LDL foi reprimido em resposta ao CiLV-C; porém, na análise em qPCR, apresentou valor de *foldchange* maior que o tratamento controle.

Figura 20. Representação dos valores de *foldchange* para os genes com potencial envolvimento na interação *Brevipalpus*-CiLV-C em relação ao controle (FC = 1): *protein kinase C* (PKC), *G protein-coupled receptor kinase-2* (GPCR), *low-density lipoprotein receptor-related protein 2* (LRP) e *c-Jun-amino-terminal kinase 4* (JNK-4). Em vermelho o tratamento com ácaros virulíferos (V); em verde o tratamento com ácaros avirulíferos (AV). Barras de erro representam o desvio padrão.

Visando entender a forma como o CiLV-C se movimenta no interior do ácaro vetor, Calegario (2009) formulou duas possíveis hipóteses para o mecanismo de transporte do vírus: a primeira se refere a rota intracelular, onde as partículas virais seriam endocitadas pela região apical do epitélio do ceco. Em seguida, seriam exocitadas na região basal, sendo liberadas no espaço intercelular das células até atingir a glândula prosomal, onde seriam novamente endocitadas e exocitadas no duto salivar. A segunda hipótese se baseia em um transporte via paracelular onde, através de uma ligação entre glicoproteínas do vírus aos receptores específicos de superfície do epitélio do ceco, uma reação em cascata induziria a desorganização do complexo juncional, levando ao deslocamento das partículas virais até o duto, procedimento facilitado pela pressão gerada através da movimentação do ácaro.

Vírus circulativos e propagativos precisam atravessar barreiras físicas para entrar no corpo de seus vetores e, para isso, alguns precisam da ajuda de receptores. Nesta expectativa, as técnicas moleculares, unindo estudos de transcriptoma e proteoma, podem levar ao avanço no entendimento da interação vírus-vetor.

Análises da interação proteína-proteína, utilizando a técnica de “far-western blot” e ensaios de imunofluorescência, permitiram observar a interação da capa proteica do luteovirus PEMV com uma proteína do pulgão da ervilha *A. pisum* (LINZ et al., 2015). Com isso, inferiu-se que o vírus se liga à proteína APN presente no intestino do vetor, e por transcitose alcança a hemocele. Chegando às glândulas salivares, o vírus precisa passar por

um segundo receptor. No entanto, estudos nesse nível de informação requerem banco de dados genômicos robustos e extenso conhecimento dos mecanismos de interação entre vírus e vetor. Requerimentos estes ainda não completos para o patossistema leprose.

Utilizando análises de “far-western blot”, eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, Seddas et al. (2004) investigaram possíveis receptores em *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) que poderiam interagir com beet western yellows virus (BWYV) (*Luteoviridae*). Por transcitose, BWYV atravessaria o intestino médio e as glândulas salivares do pulgão, processo facilitado pelas proteínas GAPDH3 e RACK-1 (receptor da proteína kinase C), as quais atuam na regulação de endocitose e de receptores de superfície, respectivamente (LI et al., 2011). Estas mesmas proteínas foram identificadas em *Laodelphax striatellus*, através de análises de espectrometria de massa e ensaios de duplo híbrido, e são responsáveis pela endocitose e transporte celular do RSV (LI et al., 2011).

As proteínas *luciferase* e *cyclophilin* também estão envolvidas na interação de afídeos com luteovírus. Estudos do proteoma de *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae) demonstraram que a eficiência na transmissão do luteovírus cereal yellow dwarf virus – RPV (CYDV-RPV) é regulada por estas proteínas, as quais são responsáveis pelo reconhecimento, endocitose e transporte das partículas virais (YANG et al., 2008).

Begomovírus também precisam interagir com proteínas para facilitar o seu transporte pelo corpo do vetor (do trato digestivo para hemolinfa; da hemolinfa para as glândulas salivares). Ensaios de duplo híbrido e imunolocalização contra capa protéica de tomato leaf curl virus (ToLCV) e cotton leaf curl virus (CLCuV) mostraram que ambos interagem com a proteína do intestino médio (*midgut protein* - MGP) de *B. tabaci* (RANA et al., 2015). Os mesmos autores relataram que a redução da MGP, após alimentação com anticorpo-MGP, levou a uma diminuição significativa na eficiência da transmissão de ToLCV.

Estes estudos envolveram técnicas de análise de interação proteína-proteína e alguns destes genes já foram descritos em literatura, com potencial envolvimento na interação vírus-vetor, porém, não foram encontrados na análise de expressão diferencial de *B. yothersi* com e sem CiLV-C.

Há dados que suportam a hipótese de que interação entre CiLV-C e *B. yothersi* seja do tipo persistente circulativa não propagativa, uma vez que nunca foi observada a presença do vírus dentro das células do ácaro. Dessa forma, é possível que *B. yothersi* não tenha receptores para endocitose, porém, as proteínas diferencialmente expressas encontradas

poderiam de alguma forma atuar na regulação da sinalização de membranas do epitélio do intestino do ácaro, auxiliando na passagem das partículas virais. Após ingestão, teriam que se mover até as glândulas salivares, alcançando o duto salivar, para novamente serem injetadas nas células de tecidos saudáveis.

Surpreendentemente, com a análise diferencial de *B. yothersi* foi observado que genes relacionados a processos de detoxificação de xenobióticos foram os mais diferencialmente expressos em ácaros virulíferos em relação ao tratamento controle (avirulífero).

Foram identificados transcritos para 25 *cytochrome P450 monooxygenases* (CYPs), 18 *acetylcholinesterases* (AChE), 16 *UDP-glucosyltransferase* (UDP), 3 *glutathione S-transferase* (GST) e 3 *ABC-transporters* (ABC). Em geral, estes genes atuam em conjunto durante o processo de detoxificação, o qual é dividido em três fases: (fase I) CYPs e esterases se ligam ao composto xenobiótico, resultando em um composto metabolizado mais reativo e solúvel em água; (fase II) em seguida, esses metabólitos são conjugados com moléculas de açúcar ou glutatona, realizada pelas UDPs e GSTs, respectivamente, aumentando a solubilidade dos compostos; (fase III) por fim, esses conjugados são transportados para fora da célula, com auxílio dos transportadores celulares (ABCs) (BAJDA et al., 2015).

Os resultados de *foldchange* para os genes de detoxificação de xenobióticos (Figura 21) evidenciam que os genes ABC, GST e AChE apresentaram os maiores valores de expressão, enquanto o CYP450 3A18 teve o menor valor de FC. Contudo, na análise estatística não houve diferença significativa entre os tratamentos (virulífero x avirulífero), sendo necessário uma nova análise com um número maior de réplicas biológicas.

Esses genes também foram expressos em populações de *P. ulmi* resistentes a acaricidas, apresentando níveis elevados de CYPs e algumas *carboxylcholinesterases* (CCEs) (BAJDA et al., 2015). No caso de *T. urticae*, ácaro com maior habilidade no desenvolvimento de resistência a pesticidas, foi observado que esses genes, além de estarem relacionados à resistência a uma diversidade de acaricidas, também estão envolvidos na adaptação a plantas hospedeiras (GRBIC et al., 2011), e devido a sua ampla polifagia, sugere-se que seja uma das maiores pragas em culturas de campo e de cultivos em estufa.

Figura 21. Representação dos valores de *foldchange* para os genes de detoxificação de xenobióticos induzidos em ácaros *B. yothersi* virulífero em relação ao controle (FC = 1). *Cytochrome P450 3A18* (CYP450 3A18), *ABC transporter G family* (ABC transporter), *Acetylcholinesterase* (AChE), *UDP-glucosyltransferase* (UDP) e *Glutathione S-transferase Mu-like* (GST). Em vermelho o tratamento com ácaros virulíferos (V); em verde o tratamento com ácaros avirulíferos (AV). Barras de erro representam o desvio padrão.

Contudo, os ácaros *B. yothersi* utilizados neste estudo não são provenientes de populações resistentes, e algumas hipóteses foram formuladas sobre o que teria levado à indução desse grande número de genes de detoxificação.

Umas destas hipóteses seria a que os frutos utilizados na manutenção e multiplicação dos ácaros virulíferos em laboratório, os quais são provenientes de campo, ainda que não pulverizados, poderiam ter apresentado doses sub-ótimas de produtos químicos, como a calda sulfocálcica que, apesar de não ter a capacidade de matar os ácaros, teria induzido a expressão dos genes relacionados ao mecanismo de detoxificação. Contudo, os frutos de laranja doce sadios e sintomáticos para leprose dos citros foram provenientes da mesma fazenda de produção orgânica, coletados no mesmo dia e, apesar de serem de talhões diferentes, foram conduzidos sob o mesmo sistema de manejo.

Por outro lado, como descrito por Arena et al. (2016), a presença de ácaros *B. yothersi* avirulíferos em *A. thaliana* induziu a produção de moléculas de ROS, cuja produção foi intensificada quando as plantas foram inoculadas com ácaros virulíferos, e apresentaram um maior acúmulo conforme o tempo de infecção viral. Por meio de ensaios para detecção de ROS em folhas sintomáticas, foi observado que as áreas lesionadas e com maior acúmulo dessas moléculas, eram as preferidas para alimentação de *B. yothersi*. Assim, supostamente,

os ácaros que se alimentaram de frutos sintomáticos teriam ingerido essas moléculas, elevando os níveis de expressão dos genes de detoxificação.

Uma terceira hipótese seria que o vírus de alguma forma induz à produção desses genes, visando contribuir com a resistência do ácaro a agentes deletérios em uma tentativa de se proteger e favorecer o seu desenvolvimento, uma vez que depende do vetor para realizar a sua disseminação para plantas hospedeiras. Essa hipótese não deve ser desconsiderada, pois há uma clara interação entre *Brevioplatus*-CiLV-C, com benefícios para ambos. Como proposto por Arena et al. (2016), a presença do ácaro levou à ativação de vias de defesa à herbivoria; entretanto, quando os ácaros estavam virulíferos, essas vias foram suprimidas, o que beneficiou o seu desempenho, pois foi notória a preferência de ácaros por plantas infectadas com CiLV-C, tanto para alimentação quanto para oviposição.

Insetos vetores podem apresentar mudanças fisiológicas e comportamentais induzidas em resposta à infecção viral, sendo que nesses casos ambos – vetor e patógeno – são beneficiados, com um evidente aumento na eficiência da transmissão (LIU et al., 2013; MALUTA et al., 2017). Estudos utilizando a técnica de monitoramento eletrônico (EPG – Electrical Penetration Graph) demonstraram que *B. tabaci* passaram mais tempo se alimentando de plantas de tomate infectadas com TYLCV do que em plantas saudas, ou seja, plantas infectadas são mais atrativas para os insetos (LIU et al., 2013). Carmo-Souza et al. (2014) também observaram essa atratividade, inferindo que cucumber mosaic virus (CMV) (*Cucumovirus*) foi capaz de manipular sua planta hospedeira infectada através da indução da produção de compostos voláteis para atrair seu vetor, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae). Contudo, nesse mesmo estudo foi observado que *A. gossypii* deu preferência por plantas saudas para reprodução. Assim, no momento que o vetor realizava a atividade de prova da planta hospedeira, ele adquiria o vírus e, consequentemente, realizava a disseminação do CMV para plantas saudas.

Dentre os genes de detoxificação, genes da super-família CYP450 são os mais estudados em trabalhos envolvendo resistência de artrópodes a pesticidas, pois são os principais responsáveis por catalisar o processo de detoxificação de uma diversidade de compostos xenobióticos e endógenos (NELSON et al., 1996). Estes genes são encontrados em todos os organismos e divididos em uma diversidade de famílias. As famílias CYP2, CYP3, CYP4, CYP6, CYP9 estão associadas a processos de adaptação à herbivoria e tolerância a inseticidas, e a CYP12 (mitocondrial) é responsável pelas vias de metabolismo de

ecdisteróides e xenobióticos (NELSON et al., 1996; KILLINY et al., 2014; BAJDA et al., 2015; BANSAL; MICHEL, 2018).

O gene CYP diferencialmente expresso detectado em nosso estudo (CYP450 3A18) provavelmente pertence ao grupo CYP3, e está relacionado à adaptação a herbivoria (BAJDA et al., 2015).

A maioria dos vírus de plantas são transmitidos por insetos, com destaque para *B. tabaci* que compreende um complexo de espécies crípticas ou biótipos (DE BARRO et al., 2011) que frequentemente apresentam resistência a inseticidas. Estudos de Karunker et al. (2008; 2009) demonstraram a associação de um gene da família CYP6 (CYP6CM1) com a resistência de *B. tabaci* ao inseticida imidacloprido, um neonicotinóide que atua no sistema nervoso central de insetos. Ensaio bioquímico demonstraram que o acúmulo do gene CYP6CM1 levou à produção de enzimas que metabolizam os compostos neonicotinóides (KARUNKER et al., 2009).

Outro neonicotinóide usado no controle de *B. tabaci* é o tiametoxam, e estudos com populações resistentes e suscetíveis demonstraram altos níveis de atividade do gene GST nos insetos resistentes (YANG et al., 2016). Por meio da técnica de RNAi, Yang et al. (2016) silenciaram o gene GST e observaram um aumento na mortalidade dos insetos.

Devido à importância dessa super-família, Killiny et al. (2014) investigaram o silenciamento de genes da família CYP4 em adultos de *D. citri* e observaram que a atividade de oxidação diminuiu após entrega de dsRNA (RNA dupla fita) específico para P450, aumentando a suscetibilidade desses insetos aos inseticidas.

A redução da atividade oxidativa (redução dos genes P450 e GST) em *D. citri* já tinha sido observada em estudos de Tiwari et al. (2011a; 2011b), onde relataram que a expressão de genes da família CYP4 era aumentada quando os psíldeos não-infectados eram expostos a inseticida. Entretanto, em psíldeos infectados com a bactéria CLas essa expressão era reduzida, tornando-os suscetíveis a inseticidas. Alguns genes dessa família também estão envolvidos em algumas atividades fisiológicas de psíldeos fêmeas, como produção de feromônio, biosíntese do hormônio juvenil e reprodução (TIWARI et al., 2011a).

Essas observações foram contrárias ao encontrado na análise do transcriptoma de *B. yothersi*. Na relação *D. citri*-CLas, a bactéria pode interferir no desenvolvimento do inseto vetor, pois estudos mostraram uma redução no desenvolvimento de ninfas e na taxa de sobrevivência dos insetos adultos após aquisição de CLas, apesar da taxa de fecundação ser

maior em fêmeas infectadas (PELZ-STELINSKI; KILLINY, 2016). Vyas et al. (2015) observaram uma redução de proteínas responsáveis pelo transporte de lipídeos (apolipoproteínas) essenciais para síntese de membrana em ninfas de *D. citri*, tornando-as mais suscetíveis a invasão pela bactéria, garantindo-lhe sua multiplicação e circulação na hemolinfa do vetor.

Por outro lado, em *B. yothersi* ocorre o contrário após aquisição de CiLV-C, pois tudo indica que há um auxílio mútuo sem efeito deletério do vírus ao ácaro vetor (FREITAS-ASTÚA et al., dados não publicados), conferindo credibilidade à terceira hipótese levantada anteriormente, através da qual o vírus induziria a expressão de genes associados a detoxificação de compostos indesejados.

Na análise de expressão diferencial de *B. yothersi* também foram identificados genes relacionados a sítios-alvos de inseticidas/acaricidas, como *catalase*, *cytochrome b ascorbate* (*cyt-b*), *acetil-coA acetyltransferase* e o gene *chitinase-3* (*Cht3*). Esses genes também foram encontrados diferencialmente expressos na análise do transcriptoma de *P. ulmi* e *P. citri* (LIU et al., 2011; BAJDA et al., 2015) resistentes e suscetíveis a acaricidas.

Os resultados de *foldchange* para os sítios-alvos de inseticida/acaricida evidenciaram que a *Cht3* apresentou o maior valor de expressão (Figura 22). As quitinases estão envolvidas em vários processos, dentre eles digestão, muda e proliferação celular (ARP et al., 2016; XIA et al., 2016). Estudos com *P. citri* encontraram uma quitinase putativa (*PcCht1*), que em larvas e ninfas expostas a acaricidas apresentaram um alto nível de transcrição em relação aos outros estágios. Por meio de silenciamento via RNAi, o nível da proteína em larvas diminuiu mais de 50% após 24 horas da dieta com dsRNA e, após 48 horas, 60,9% dos ácaros haviam morrido devido à interferência no processo de muda (XIA et al., 2016). Esse gene, possivelmente, seria um ótimo alvo para estudos de silenciamento gênico em ácaros *B. yothersi* e deverá ser melhor investigado.

Também foram encontrados 17 genes relacionados à digestão (6 *cathepsin B*, 3 *cathepsin L*, 2 *legumain* e 6 *trypsin*), os quais foram induzidos em *B. yothersi* virulíferos. As catepsinas fazem parte de uma grande família de proteases digestivas que atuam na quebra de proteases da planta (BANSAL; MICHEL, 2018) e podem estar envolvidas no processo de adaptação à herbivoria. No resultado de *foldchange* os genes *cathepsin B* (*CathB*) e *legumain* foram mais expressos em ácaros virulíferos (Figura 22).

Em ácaros *T. urticae* foram encontradas 27 catepsinas do tipo B e 29 do tipo L, sendo observado que a atividade da *cathepsin B* foi maior em ácaros mantidos em milho,

comparados com os ácaros mantidos em feijão (GRBIC et al., 2011; SANTAMARÍA et al., 2015), conferindo a estes uma relação na adaptação a plantas hospedeiras. Na análise do transcriptoma dessa importante praga da agricultura, as catepsinas B e L, juntamente com as legumainas, foram mais expressas em larvas, ninfas e adultos, em comparação com embriões (GRBIC et al., 2011).

Figura 22. Representação dos valores de *foldchange* para sítios-alvos de inseticida/acaricida e digestão encontrados em *B. yothersi*, em relação ao controle (FC = 1): *Chitinase-3* (Cht3), *catalase*, *cytochrome b ascorbate-dependent protein* (Cyt-b), *acetil-coA acetyltransferase* (Acetil-coA), *cathepsin-B* (CathB), *cathepsin-L1* (CathL), *trypsin-1* (Tryp1) e *legumain*. Em vermelho o tratamento com ácaros virulíferos (V); em verde o tratamento com ácaros avirulíferos (AV). Barras de erro representam o desvio padrão.

Genes relacionados ao metabolismo primário também foram encontrados na análise diferencial de *B. yothersi*, sendo que 168 genes foram induzidos e 85 genes reprimidos em ácaros virulíferos. A maioria dos genes reprimidos está envolvida no metabolismo de aminoácidos e carboidratos. Para validação em RT-qPCR foram selecionados dois genes induzidos e relacionados à produção de proteínas e metabolismo de lipídeos, como o *28S ribosomal protein S23* e *pancreatic lipase-related protein 2-like*, e um gene reprimido que está relacionado ao metabolismo de aminoácidos, o *histone-lysine N-methyltransferase SETD2-like* (Figura 23).

Genes relacionados a imunidade humoral, imunidade celular como *serine protease* e resposta antiviral/estresse como *zinc finger* e *heat shock 71 kDa protein* (HSP71) (Figura 23) foram induzidos em ácaros *B. yothersi* em resposta a CiLV-C. As HSPs são proteínas

abundantes em artrópodes e são induzidas em resposta ao estresse ambiental, seja ele causado por um fator biótico (vírus, bactérias, fungos) ou abiótico (pesticidas, temperatura), atuando na proteção celular contra infecção a patógenos (ZHAO; JONES, 2012; LU; KILLINY; 2017).

Em *B. tabaci*, a resposta à infecção com TYLCV mostrou que HSPs foram induzidas pela ingestão e retenção do vírus, inferindo que estão intimamente associadas à forma de transmissão de geminivirus (persistente circulativa) (GOROVITS; CZOSNEK, 2017). Essa indução também foi observada em plantas de tomate quando inoculadas com insetos virulíferos para TYLCV (GOROVITS et al., 2007; GOROVITS; CZOSNEK, 2017).

Figura 23. Representação dos valores de *foldchange* de genes relacionados ao metabolismo primário e imunidade de *B. yothersi*, em relação ao controle (FC = 1): *28S ribosomal protein* (28S), *pancreatic lipase-related protein 2-like* (PLRP2), *histone-lysine N-methyltransferase* (hist-lysine), *serine protease ami-like*, *zinc finger* e *heat shock 71 kDa protein* (HSP71). Em vermelho o tratamento com ácaros virulíferos (V); em verde o tratamento com ácaros avirulíferos (AV). Barras de erro representam o desvio padrão.

Nos insetos em geral, o sistema imune é controlado por três vias de sinalização: via Toll, que responde ao reconhecimento de bactérias gram-positivas, fungos e vírus; via IMD (via de imunodeficiência – *immune deficiency pathway*), responsável pelo reconhecimento de bactérias gram-negativas; e a via JAK/STAT (*janus kinase/signal transducers and activator of transcription*), que atua nas respostas imunes humorais e celulares para bactérias, fungos e vírus, e é induzida por citocinas (ARP et al., 2017).

Entretanto, na análise diferencial de *B. yothersi*, genes relacionados a vias de sinalização Toll (*serine/threonine protein kinase* e *NF-kappa B inhibitor cactus*) e IMD (*TNF-receptor-associated factor4*), além de proteínas de reconhecimento de peptidoglicana (PRR) como *down syndrome cell adhesion* e *scavenger receptor*, foram reprimidos nos ácaros após exposição ao CiLV-C.

A ativação dessas vias de sinalização foi observada na análise da expressão diferencial de *B. tabaci* em resposta à infecção pelo begomovirus TYLCCNV, principalmente genes responsáveis pela autofagia, usados como estratégia para proteger o vetor contra a infecção, e alguns peptídeos antimicrobianos (LUAN et al., 2011). Entretanto, o TYLCCNV levou à supressão de genes relacionados à sinalização da via Toll, o que favorece a persistência do vírus no vetor, resultando em uma relação coevolutiva entre vírus-vetor. Isso foi o contrário do observado na interação entre *F. occidentalis* e TSWV, onde a via de sinalização Toll foi induzida em resposta ao vírus (ZHANG et al., 2013), levando à degradação de partículas virais.

A partir da análise da primeira versão da anotação do genoma do psílideo *D. citri* foi observado que o seu sistema imune inato é reduzido em comparação a outros hemipteras, e genes relacionados à via IMD são praticamente ausentes (ARP et al., 2016; 2017). Isso foi confirmado através de estudos onde os psíldeos foram expostos (via ingestão) a bactéria entomopatogênica gram-negativa *Serratia marcescens*, resultando em uma alta taxa de mortalidade, pois com a ausência dessa via o psílideo se tornou incapaz de eliminar a bactéria (ARP et al., 2017). Em contrapartida, a infecção com CLas (bactéria da planta) não leva à mortalidade do psílideo, pois este investe menos em sua defesa (via Toll reduzida), favorecendo a disseminação da bactéria em pomares de citros (VYAS et al., 2015; ARP et al., 2017).

Dentre os GDE selecionados, poucos foram efetivamente validados em RT-qPCR (Figura 24); porém, deverão ser reavaliados, pois apresentam papel potencialmente relevante na transmissão e/ou resposta do ácaro ao vírus.

Figura 24. Validação da expressão diferencial de *B. yothersi* por RT-qPCR. Vinte transcritos induzidos e três reprimidos de acordo com análise de expressão gênica diferencial de dados do RNAseq, e selecionados para análise em qPCR (apresentados como a média das três réplicas). Barras de erro representam o desvio padrão.

Os GDE selecionados não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (ácaros virulíferos x avirulíferos), mas nota-se uma tendência de diferenciação na expressão. Isso possivelmente pode ter ocorrido pois as análises RT-qPCR foram realizadas com um novo bioensaio e com um *pool* de ácaros, de maneira que nem todos os indivíduos mantidos em fonte de inóculo adquiriram a mesma concentração de vírus. Ou seja, apresentaram valores pequenos e abaixo do limite de detecção da expressão gênica ou, pode ser que esses genes não sejam realmente diferencialmente expressos e as diferenças observadas nas análises de RNAseq representam erros experimentais.

O mesmo ocorreu em estudo de Kubo (2011), quando a análise da expressão diferencial de citros em resposta à infecção por CiLV-C sugeriu que genes envolvidos no mecanismo de silenciamento gênico, como o gene argonauta 2 (AGO2), eram induzidos mediante infecção viral. Porém, seus dados não foram validados estatisticamente por RT-qPCR. Posteriormente, Arena (2014) utilizou a planta modelo *Arabidopsis thaliana*, planta suscetível ao CiLV-C (ARENA et al., 2013), e encontrou os mesmos GDE e conseguiu validá-los utilizando um maior número de repetições experimentais.

Em conclusão, através do transcriptoma de *B. yothersi* foram obtidos 5.600 transcritos diferencialmente expressos, e desses 2.736 foram induzidos em resposta ao CiLV-C. Com esses dados foram identificados genes com possível envolvimento na interação

ácaro-vírus, que podem auxiliar no transporte das partículas virais por entre as membranas epiteliais do ceco. Também foram identificados genes relacionados à detoxificação de xenobióticos, o que seria esperado para um ácaro de hábito polífago. Entretanto, a expressão desses genes apresentou valores mais elevados quando os ácaros foram expostos ao CiLV-C, podendo-se hipotetizar que o vírus estaria manipulando o ácaro para sua proteção. Tal fato contribuiria para a disseminação do vírus em campo. Outra importante hipótese seria que a ingestão de moléculas de ROS, liberadas em função da infecção viral, contribuiria para a indução desses transcritos.

Os resultados forneceram novos conhecimentos para o entendimento da interação *B. yothersi*-CiLV-C. Como perspectiva futura, os dados disponibilizados no transcriptoma de *B. yothersi* oferecerem subsídios para outros estudos funcionais. Dentre estes, a tecnologia de silenciamento gênico por RNAi, uma técnica que vem sendo investigada para aplicação no controle de pragas e vetores de importância agronômica.

6. CONCLUSÕES

1. Este foi o primeiro trabalho de transcriptoma com foco na interação ácaro vetor-vírus;
2. Foram identificados genes potencialmente envolvidos na detoxificação de xenobióticos, sítios-alvos de inseticida/acaricida e interação vírus-vetor;
3. O número elevado de genes relacionados a detoxificação sugere um possível efeito direto do vírus no ácaro, através da alimentação de moléculas de ROS, e um efeito indireto onde o vírus poderia auxiliar no fitness do ácaro para benefício de ambos;
4. Outros genes com perfil de expressão diferencial poderão ser investigados para trabalhos usando a estratégia de silenciamento gênico (RNAi) com vistas aos estudos funcionais e alternativas futuras ao manejo e controle deste vetor.

REFERÊNCIAS

- AMMAR, E.D.; TSAI, C.W.; WHITFIELD, A.E.; REDINBAUGH, M.G.; HOGENHOUT, S.A. Cellular and molecular aspects of Rhabdovirus interactions with insect and plant hosts. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 447-468, 2009.
- AFONSO, C.L.; AMARASINGHE, G.K.; BÁNYAI, K.; BÀO, Y.; BASLER, C.F.; BAVARI, S.; BEJERMAN, N.; BLASDELL, K.R.; BRIAND, F-X.; BRIESE, T.; et al. Taxonomy of the order *Mononegavirales*: update 2016. **Archives of Virology**, v. 161, p. 2351-2360, 2016.
- ANDER, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, v. 11, n. 10, p. R106, 2010.
- ANDERS, S.; MCCARTHY, D.J.; CHEN, Y.; OKONIEWSKI, M.; SMYTH, G.K.; HUBER, W.; ROBINSON, M.D. Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. **Nature protocols**, v. 8, n. 9, p. 1765-1786, 2013.
- ANDERS, S.; PYL, P.T.; HUBER, W. HTSeq - a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 2, p. 166-169, 2015.
- ARENA, G.D.; BERGAMINI, M.P.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W.; KUBO, K.S.; FREITAS-ASTÚA, J. *Citrus leprosis virus C* infects *Arabidopsis thaliana*, the model for plant-pathogen interactions. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, p. 448, 2013.
- ARENA, G.D. Análise da expressão gênica de *Arabidopsis thaliana* em resposta ao *Citrus leprosis virus C* e ao seu vetor *Brevipalpus phoenicis*. 2014. 143 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2014.
- ARENA, G.D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; NUNES, M.A.; ALVES, M.R.; CAMARGO, L.E.A.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. *Citrus leprosis virus C* infection results in hypersensitive-like response, suppression of the JA/ET plant defense pathway and promotion of the colonization of its mite vector. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1757, p. 1-17, 2016.
- ARP, A.P.; HUNTER, W.B.; PELZ-STELINSKI, K.S.; Annotation of the Asian citrus psyllid genome reveals a reduced innate immune system. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 570, 2016.
- ARP, A.P.; MARTINI, X.; PELZ-STELINSKI, K.S. Innate immune system capabilities of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 148, p. 94-101, 2017.
- BAJDA, S.; DERMAUW, W.; GREENHALGH, R.; NAUEN, R.; TIRRY, L.; CLARK, R.M.; LEEUWEN, T.V. Transcriptome profiling of a spiroadiclofen susceptible and resistant strain of the European red mite *Panonychus sulmi* using strand-specific RNA-seq. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1-26, 2015.

- BANSAL, R.; MICHEL, A. Expansion of cytochrome P450 and cathepsin genes in the generalist herbivore brown marmorated stink bug. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 60, 2018.
- BASSANEZI, R.B. Leprose dos citros: foco no controle do ácaro vetor. **Visão Agrícola**, v. 1, n. 2, p. 25-29, 2004.
- BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; NOVELLI, V.M. Viruliferous *Brevipalpus phoenicis* gradient from Citrus leprosis affected trees. In: **International Citrus Congress**, 12, p. 235, 2012.
- BASSANEZI, R.B. Fatores que dificultam o controle do ácaro da leprose. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/fatores-que-dificultam-o-controle-do-acaro-da-leprose/645>>. Acesso em 26 jan. 2018.
- BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; Machado, M.A. The citrus leprosis pathosystem. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 3, p. 211-220, 2006.
- BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.M.; KITAJIMA, E.W.; KUBO, K.S.; BASSANEZI, R.B.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus Leprosis: Centennial of an Unusual Mite – Virus Pathosystem. **Plant Disease**, v. 94, n. 3, p. 284-292, 2010.
- BEARD, J.J.; OCHOA, R.; BRASWELL, W.E.; BAUCHAN, G.R. *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) species complex (Acari: Tenuipalpidae) – a closer look. **Zootaxa**, v. 3944, n. 1, p. 001-067, 2015.
- BLANC, S.; DRUCKER, M.; UZEST, M. Localizing viruses in their insect vector. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, p. 403-425, 2014.
- BOLGER, A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.
- BONIZZONI, M.; DUNN, W.A.; CAMPBELL, C.L.; OLSON, K.E.; MARINOTTI, O.; JAMES, A.A. Complex modulation of the *Aedes aegypti* transcriptome in response to dengue virus infection. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. e50512, 2012.
- CALEGARIO, R.F. Detecção do vírus da leprose dos citros nos tecidos da planta infectada e do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae). 2009. 123 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2009.
- CARMO-SOUZA, M.; MORENO, A.; GARZO, E.; FERERES, A. A non-persistently transmitted-virus induces a pull-push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. **Virus Research**, v. 186, p. 38-46, 2014.
- CHIAVEGATO, L.G. Aspectos biológicos e transmissão de leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em citros. **Laranja**, v. 17, n. 1, p. 229-295, 1996.

- CHILDERS, C.C.; DERRICK, K.S. *Brevipalpus* mites as vectors of un assigned rhabdoviruses in various crops. **Experimental and Applied Acarology**, v. 30, p. 1-3, 2003.
- CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.V.; WELBOURN, W.C. Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of viral diseases vectored by these mites. **Experimental and Applied Acarology**, v. 30, p. 29-105, 2003a.
- CHILDERS, C.C.; FRENCH, J.V.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis* and *B. lewisi* (Acari: Tenuipalpidae): a review of their biology, feeding injury and economic importance. **Experimental and Applied Acarology**, v. 30, p. 5-28, 2003b.
- COLARICCIO, A.; LOVISOLO, O.; CHAGAS, C.M.; GALETTI, S.R.; ROSSETTI, V.V.; KITAJIMA, E.W. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis virus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 208-213, 1995.
- CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 12, n. 18, p. 3674-3676, 2005.
- CZOSNEK, H.; GHANIM, M.; GHANIM, M. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci* – insights from studies with Tomato yellow leaf curl virus. **Annals of Applied Biology**, v. 140, p. 215-231, 2002.
- CZOSNEK, H.; GHANIM, M. Back to basics: are Begomovirus whitefly pathogens? **Journal of Integrative Agriculture**, v. 11, n. 2, p. 225-234, 2012.
- DÁDER, B.; THEN, C.; BERTHELOT, E.; DUCOUSSO, M.; NG, J.C.K.; DRUCKER, M. Insect transmission of plant viruses: multilayered interactions optimize viral propagation. **Insect Science**, v. 24, n. 6, p. 929-946, 2017.
- DE BARRO, P.J.; LIU, S.S.; BOYKIN, L.M.; Dinsdale, A.B. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. **Annual review of entomology**, v. 56, p. 1–19, 2011.
- DIETZGEN, R.G.; KUHN, J.H.; CLAWSON, A.N.; FREITAS-ASTÚA, J.; GOODIN, M.M.; KITAJIMA, E.W.; KONDO, H.; WETZEL, T.; WHITFIELD, A.E. Dichorhavirus: a proposed new genus for *Brevipalpus* mite-transmitted, nuclear, baciliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. **Archives of Virology**, v. 159, n. 3, p. 607-619, 2014.
- FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M. de. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. 730 p.
- FERERES, A.; RACCAH, B. Plant virus transmission by insects. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2015.

- FERREIRA, C.R.R.P.T.; CAMARGO, M.L.B.; VEGRO, C.L.R. **Defensivos Agrícolas**: vendas batem novo recorde em 2012 e segue em ritmo forte em 2013. *Análises e Indicadores do Agronegócio*, Instituto de Economia Agrícola – IEA, v. 8, n. 7, 2013. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=12700>>. Acesso em: 08 mar. 2016.
- FUNDECITRUS, 2018. Reestimativa da safra de laranja 2017/18 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro: fechamento em abril/2018/Fundo de Defesa da Citricultura... [et al.]. – Araraquara, SP: Fundecitrus, 2018.
- GARITA, L.C.; TASSI, A.D.; CALEGARIO, R.F.; FREITAS-ASTÚA, J.; SALAROLI, R.B.; ROMÃO, G.O.; KITAJIMA, E.W. Experimental host range of *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C). **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 1, p. 43-55, 2014.
- GENTLEMAN, R.C.; CAREY, V.J.; BATES, D.M.; BOLSTAD, B.; DETTLING, M.; DUDOIT, S.; ELLIS, B.; GAUTIER, L.; GE, Y.; GENTRY, J.; HORNIK, K.; HOTHORN, T.; HUBER, W.; IACUS, S.; IRIZARRY, R.; LEISCH, F.; LI, C.; MAECHLER, M.; ROSSINI, A.J.; SAWITZKI, G.; SMITH, C.; SMYTH, G.; TIERNEY, L.; YANG, J.YH.; ZHANG, J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v. 5, n. 10, p. R80, 2004.
- GOROVITS, R.; AKAD, F.; BEERY, H.; VIDAUSKY, F.; MAHADAV, A.; CZOSNEK, H. Expression of stress-response proteins upon whitefly-mediated inoculation of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in susceptible and resistant tomato plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, p. 1376-1383, 2007.
- GOROVITS, R.; CZOSNEK, H. The involvement of heat shock proteins in the establishment of *Tomato yellow leaf curl virus* infection. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-12, 2017.
- GOTTLIEB, Y.; ZCHORI-FEIN, E.; MOZES-DAUBE, N.; KONTSEDALOV, S.; SKALJAC, M.; BRUMIN, M.; SOBOL, I.; CZOSNEK, H.; VAVRE, F.; FLEURY, F.; GHANIM, M. The transmission efficiency of *Tomato yellow leaf curl virus* by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. **Journal of Virology**, v. 84, n. 18, 9310. Doi:10.1128/JVI.00423-10, 2010.
- GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; WILLIAMS, T.D.; NAGARAJ, S.H.; NUEDA, M.J.; ROBLES, M.; TALÓN, M.; DOPAZO, J.; CONESA, A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 10, p. 3420-3435, 2008.
- GRAY, S.M. Plant virus proteins involved in natural vector transmission. **Trend in Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 259-264, 1996.
- GRBIC, M. et al. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. **Nature**, v. 479, p. 487-492, 2011.

- GROOT, T.V.M.; BREEUWER, J.J. Cardinium symbionts induce haploid thelytoky in most clones of three closely related *Brevipalpus* species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 39, n. 3-4, p. 257-271, 2006.
- GU, L.; KNIPPLE, D.C. Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies. **Crop Protection**, v. 45, p. 36-40, 2013.
- HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, v. 87, n. 3, p. 330-353, 2004.
- HARAMOTO, F.H. Biology and control of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acarina: Tenuipalpidae). Honolulu: Hawaii Agricultural Experimental Station, 1969. 63 p. (Technical Bulletin, 68).
- HARTUNG, J.S.; ROY, A.; FU, S.; SHAO, J.; SCHNEIDER, W.L.; BRLANSKY, R.H. History and diversity of Citrus leprosis virus recorded in herbarium specimens. **Phytopathology**, v. 105, n. 9, p. 1277-1284, 2015.
- HÖFER, P.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; JESKE, H.; FRISCHMUTH, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible Geminivirus isolate. **Virology**, v. 236, n. 2, p. 288-295, 1997.
- HOGENHOUT, S.A.; AMMAR, EL-D.; WHITFIELD, A.E.; REDINBAUGH, M.G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review Phytopathology**, v. 46, p. 327-359, 2008.
- HOY, M.A. et al. Genome sequencing of the phytoseiid predatory mite *Metaseiulus occidentalis* reveals completely atomized *Hox* genes and superdynamic intron evolution. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, n. 6, p. 1762-1775, 2016.
- HULL, R. **Matthew's Plant Virology**. 4th. Ed. San Diego, California, 2002. P. 485-531.
- JEYAPRAKASH, A.; HOY, M.A. The nuclear genome of the phytoseiid *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) is among the smallest known in arthropods. **Experimental and Applied Acarology**, v. 47, p. 263-273, 2009.
- KANAKALA, S.; GHANIM, M. Implication of the whitefly *Bemisia tabaci* Cyclophilin B protein in the transmission of *Tomato yellow leaf curl virus*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 1702, doi:10.3389/fpls.2016.01702, 2016.
- KARUNKER, I.; BENTING, J.; LUEKE, B.; PONGE, T.; NAUEN, R.; RODITAKIS, E.; VONTAS, J.; GORMAN, K.; DENHOLM, I.; MORIN, S. Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 634-644, 2008.

- KARUNKER, I.; MOROU, E.; NIKOU, D.; NAUEN, R.; SERTCHOOK, R.; STEVENSON, B.J.; PAINE, M.J.I.; MORIN, S.; VONTAS, J. Structural model and functional characterization of the *Bemisia tabaci* CYP6CM1 vQ a cytochrome P450 associated with high levels of imidacloprid resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 697-706, 2009.
- KAUR, N.; HASEGAWA, D.K.; LING, K-S.; WINTERMANTEL, W.M. Application of genomics for understanding plant virus-insect vector interactions and insect vector control. **Phytopathology**, v. 106, n. 10, p. 1213-1222, 2016.
- KILLINY, N.; HAJERI, S.; TIWARI, S.; GOWDA, S.; STELINSKI, L.L. Double-stranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five CYP4 genes and suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri*. **PLOS One**, v. 9, n. 10, e110536, 2014.
- KIM, D.; PERTEA, G.; TRAPNELL, C.; PIMENTEL, H.; KELLEY, R.; SALZBERG, S. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. **Genome Biology**, v. 14, n. 4, p. R36, 2013.
- KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; RODRIGUES, J.V.C. *Brevipalpus* transmitted plant virus and virus like disease: cytopathology and some recent cases. **Experimental and Applied Acarology**, v. 30, p. 135-160, 2003.
- KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.C.V.; FREITAS-ASTÚA, J. An annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus* mite-transmitted viruses. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 3, p. 348-371, 2010.
- KITAJIMA, E.W.; NOVELLI, V.M.; ALBERTI, G. Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* Mites (Tenuipalpidae, Prostigmata, Actinotrichida). Part 1: An update on the biology and economic importance of *Brevipalpus* mites. **Zoologica**, 2014. 160p.
- KITAJIMA, E.W.; ALBERTI, G. Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae) – economically important plant-virus vectors. Part 7: Ultrastructural detection of cytoplasmic and nuclear types of *Brevipalpus*-transmitted viruses. **Zoologica**, v. 160, p. 173-192, 2014.
- KRUSE, A.; FATTAH-HOSSEINI, S.; SAHA, S.; JOHNSON, R.; WARWICK, E.R.; STURGEON, K.; MUELLER, L.; MACCOSS, M.J.; JR. SHATTERS, R.G.; HECK, M.C. Combining'omics and microscopy to visualize interactions between the Asian citrus psyllid vector and the Huanglongbing pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the insect gut. **PLOS One**, v. 12, n. 6, p. e0179531, 2017.
- KUBO, K.S. Expressão gênica diferencial de genótipos de citros em resposta à infecção do vírus da leprose dos citros. 2011. 167 p. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP, 2011.

- LÉON, M.G.; BECERRA, C.H.; FREITAS-ASTÚA, J.; SALAROLI, R.B.; KITAJIMA, E.W. Natural infection of *Swinglea glutinosa* by the Citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C) in Colombia. **Plant Disease**, v. 92, p. 1364, 2008.
- LI, S.; XIONG, R.; WANG, X.; ZHOU, Y. Five proteins of *Laodelphax striatellus* are potentially involved in the interactions between Rice stripe virus and vector. **PLOS ONE**, v. 6, n. 10, p. 1-9, 2011.
- LI, C.; YUN, X.; HU, X.; ZHANG, Y.; SANG, M.; LIU, X.; WU, W.; LI, B. Identification of G protein-coupled receptors in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Genomics**, v. 102, p. 345-354, 2013.
- LINZ, L.B.; LIU, S.; CHOUGULE, N.P.; BONNING, B.C. *In vitro* evidence supports membrane alanyl aminopeptidase N as a receptor for a plant virus in the Pea aphid vector. **Journal of Virology**, v. 89, n. 22, p. 11203-11212, 2015.
- LIU, S.S.; DE BARRO, P.J.; XU, J.; LUAN, J.B.; ZANG, L.S.; RUAN, Y.M.; WAN, F.H. Asymmetric mating interactions drive widespread invasion and displacement in a whitefly. **Science**, v. 318, p. 1769-1772, 2007.
- LIU, S.; SIVAKUMAR, S.; SPARKS, W.O.; MILLER, W.A.; BONNING, B.C. A peptide that binds the pea aphid gut impedes entry of pea enation mosaic virus into the aphid hemocoel. **Virology**, v. 401, p. 107-116, 2010.
- LIU, B.; JIANG, G.; ZHANG, Y.; LI, J.; LI, X.; YUE, J.; CHEN, F.; LIU, H.; LI, H.; ZHU, S.; WANG, J.; RAN, C. Analysis of transcriptome differences between resistant and susceptible strains of the citrus red mite *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae). **PLOS ONE**, v. 6, n. 12, p. 1-9, 2011.
- LIU, B.; PREISSER, E.L.; CHU, D.; PAN, H.; XIE, W.; WANG, S.; WU, Q.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Multiple forms of vector manipulation by a plant-infecting virus: *Bemisia tabaci* and *Tomato yellow leaf curl virus*. **Journal of Virology**, v. 87, n. 9, p. 4929-4937, 2013.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; DE SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTÚA-MONGE, G.; ANTONIOLI, R.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. Development of a Molecular Tool for the Diagnosis of Leprosis, a Major Threat to Citrus Production in the Americas. **Plant Disease**, v. 87, n. 9, p. 1317-1321, 2003.
- LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTÚA-MONGE, G.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; RODRIGUES, V.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 2721-2729, 2006.

- LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J. & MACHADO, M.A. Genus Cilevirus. In: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B. & Lefkowitz, E.J (Eds). **Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses**. San Diego: Elsevier, p. 1139-1142, 2012.
- LU, Z.; KILLINY, N. Huanglongbing pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* exploits the energy metabolism and host defence responses of its vector *Diaphorina citri*. **Physiological Entomology**, v. 42, n. 4, p. 319-335, 2017.
- LUAN, J-B.; LI, J-M.; VARELA, N.; WANG, Y-L.; LI, F-F.; BAO, Y-Y.; ZHANG, C-X.; LIU, S-S.; WANG, X-W. Global analysis of the transcriptional response of whitefly to *Tomato yellow leaf curl China virus* reveals the relationship of coevolved adaptations. **Journal of Virology**, v. 85, n. 7, p. 3330-3340, 2011.
- MALUTA, N.K.P.; FERERES, A.; LOPES, J.R.S. Settling preferences of the whitefly vector *Bemisia tabaci* on infected plants varies with virus family and transmission mode. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 165, n. 2-3, p. 138-147, 2017.
- MELZER, M.J.; SETHER, D.M.; BORTH, W.B.; HU, J.S. Characterization of a virus infecting *Citrus volkameriana* with citrus leprosis-like symptoms. **Phytopathology**, v. 102, n. 1, p. 122-127, 2012.
- MINEIRO, J.L.C.; SATO, M.E.; OCHOA, R. Variabilidade morfológica e morfométrica em diferentes populações (morfoespécies) de *Brevipalpus phoenicis*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 4, 2013, Bento Gonçalves – RS. **Anais...** Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, 2013. CD-ROM.
- MINEIRO, J.L.C.; SATO, M.E.; OCHOA, R.; RAGA, A.; NOVELLI, V.M.; OCHOA, R.; BAUCHAN, G.R. *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) *sensu lato* (Acari: Tenuipalpidae) no Brasil. Documento Técnico, v. 31, p. 1-21, 2017.
- MOOTHA, V.K.; LINDGREN, C.M.; ERIKSSON, K.F.; SUBRAMANIAN, A.; SIHAG, S.; LEHAR, J.; PUIGSERVER, P.; CARLSSON, E.; RIDDERSTRALE, M.; LAURILA, E.; HOUSTIS, N.; DALY, M.J.; PATTERSON, N.; MESIROV, J.P.; GOLUB, T.R.; TAMAYO, P.; SPIEGELMAN, B.; LANDER, E.S.; HIRSCHHORN, J.N.; ALTSHULER, D.; GROOP, L.C. PCC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. **Nature Genetics**, v. 34, n. 3, p. 267-273, 2003.
- MORIN, S.; GHANIM, M.; ZEIDAN, M.; CZOSNEK, H.; VERBEEK, M.; VAN DEN HEUVELT, J.F.J.M. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of *Tomato yellow leaf curl virus*. **Virology**, v. 256, n. 1, p. 75-84, 1999.
- MORIN, S.; GHANIM, M.; SOBOL, I.; CZOSNEK, H. The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. **Virology**, v. 276, n. 2, p. 404-416, 2000.

- NAVIA, D.; MENDONÇA, R.S.; FERRAGUT, F.; MIRANDA, L.C.; TRINCADO, R.C.; MICHAUX, J.; NAVAJAS, M. Cryptic diversity in *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae). **Zoologia Scripta**, v. 42, n. 2, p. 406-4026, 2013.
- NELSON, D.R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J.J.; FEYEREIEN, R.; WAXMN, D.J.; WATERMAN, M.R.; GOTOH, O.; COON, M.J.; ESTABROOK, R.W.; GUNSALUS, I.C.; NEBERT, D.W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, v. 6, p. 1-42, 1996.
- NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. São Paulo: **CitrusBR**, 2010. 138p.
- NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G. Anuário da Citricultura 2017. São Paulo: **CitrusBR**, 2017. 60p.
- NG, J.C.K.; FALK, B.W. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 183-212, 2006.
- NIU, J.Z.; DOU, W.; DING, T.B.; SHEN, G.M.; ZHANG, K.; SMAGGHE, G.; WANG, J.J. Transcriptome analysis of the citrus red mite, *Panonychus citri*, and its gene expression by exposure to insecticide/acaricide. **Insect Molecular Biology**, v. 21, n. 4, p. 422-436, 2012.
- NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; SEGATTI, N.; HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R.; MACHADO, M.A. Aquisição e inoculação do vírus da leprose dos citros (CiLV-C) por machos e fêmeas de *Brevipalpus phoenicis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. S293, 2007. Suplemento.
- NUNES, M.A.; OLIVEIRA, C.A.L.; OLIVEIRA, M.L.; KITAJIMA, E.W.; HILF, M.E.; GOTTWALD, R.T.; FREITAS-ASTÚA, J. Transmission of Citrus leprosis virus, cytoplasmic type, by *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) to alternate host plants found in Citrus orchads. **Plant Disease**, v. 96, p. 968-972, 2012a.
- NUNES, M.A.; BERGAMINI, M.P.; COERINI, L.F.; BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.M.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) naturally infecting *Commelina benghalensis*, a prevalent monocot weed of citrus orchads in Brazil. **Plant Disease**, v. 96, n. 5, p. 770, 2012b.
- NUNES, M.A.; MINEIRO, J.L.C.; ROGERIO, L.A.; FERREIRA, L.M.; TASSI, A.D.; NOVELLI, V.M.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. First report of *Brevipalpus papayensis* Baker (Acari: Tenuipalpidae) as vector of *Coffee ringspot virus* and *Citrus leprosis virus C*. **Plant Disease**, 2017.
- PAKPOUR, N.; CAMP, L.; SMITHERS, H.M.; WANG, B.; TU, Z.; NADLER, S.A.; LUCKHART, S. Protein kinase C-dependent signaling controls the midgut epithelial barrier to malaria parasite infection in anopheline mosquitoes. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, p. e76535, 2013.

- PELZ-STELINSKI, K.S.; KILLINY, N. Better together: association with *Candidatus Liberibacter asiaticus* increases the reproductive fitness of its insect vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 109, n. 3, p. 371-376, 2016.
- PRICE, D.P.; NAGARAJAN, V.; CHURBANOV, A.; HOUDE, P.; MILLIGAN, B.; DRAKE, L.L.; GUSTAFSON, J.E.; HANSEN, I.A. The fat body transcriptomes of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*, pre- and post-blood meal. **PLOS ONE**, v. 6, n. 7, p. 1-13, 2011.
- RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; GUERRA-PERAZA, O.; BRETON, M.C.; ARENA, G.D.; NUNES, M.A.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Phylogenetic and molecular variability studies reveal a new genetic clade of *Citrus leprosis virus C*. **Viruses**, v. 8, n. 153, p. v8060153, 2016.
- RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; GUERRA-PERAZA, O.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W.; HAKAKAVA, R.; SALAROLI, R.B.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus leprosis virus N: a new dichorhavirus citrus leprosis disease. **Phytopathology**, v. 107, n. 8, p. 963-976, 2017.
- RANA, V.S.; POPLI, S.; SAURAV, G.K.; RAINA, H.S.; CHAUBEY, R.; RAMAMURTHY, V.V.; RAJAGOPAL, R. A *Bemisia tabaci* midgut protein interacts with begomoviruses and plays a role in virus transmission. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 663-678, 2015.
- RODRIGUES, V.; BASTIANEL, M.; KUBO, K.S.; FADEL, A.L.; NICOLINI, F.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J. Desenvolvimento de um método para a otimização da transmissão experimental do vírus da leprose dos citros. **Laranja**, v. 28, n. 1, p. 29-38, 2007.
- RODRIGUES, J.C.V.; CHILDERS, C.C. Brevipalpus mites (Acari: Tenuipalpidae): vectors of invasive, non-systemic cytoplasmic and nuclear viruses in plants. **Experimental and Applied Acarology**, v. 59, p. 165-175, 2013.
- RODRIGUES, J.C.V.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W. Brevipalpus spp. (Acari: Tenuipalpidae): Vectors of cytoplasmic and nuclear viruses in plants – Part 6: Circulative (Persistent) Pathogen-Vector Complexes: Propagative. In: Judith K. Brown (ed.): **Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens**. St. Paul, Minnesota, APS Books, 2016. 496p.
- ROGERIO, L.A.; MACHADO, M.A.; GALDEANO, D.M.; MONTELATTO, L.; ARENA, G.D.; NUNES, M.A.; NOVELLI, V.M. Selection of reference genes for functional genomic studies in *Brevipalpus yotheri* (Acari: Tenuipalpidae), vector of the citrus leprosis virus. In: Brazilian-International Congress of Genetics, 2017, Águas de Lindóia – SP. **Anais... Águas de Lindóia**, São Paulo, 2017.
- ROSEN, R. et al. Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vector. **Current Opinion in Virology**, v. 15, p. 1-8, 2015.

- ROY, A.; CHOUDHARY, N.; GUILLERMO, L.M.; SHAO, J.; GOVINDARAJULU, A.; ACHOR, D.; WEI, G.; PICTON, D.D.; LEVY, L.; NAKHLA, M.K.; HARTUNG, J.S.; BRLANSKY, R.H. A novel virus of the genus *Cilevirus* causing symptoms similar to citrus leprosis. **Phytopathology**, v. 103, p. 488-500, 2013a.
- ROY, A.; STONE, A.; OTERO-COLINA, G.; WEI, G.; CHOUDHARY, N.; ACHOR, D.; SHAO, J.; LEVY, L.; NAKHLA, M.K.; HOLLINGSWORTH, C.R.; HARTUNG, J.S.; SCHNEIDER, W.L.; BRLANSKY, R.H. Genome assembly of citrus leprosis virus nuclear type reveals a close association with orchid fleck virus. **Genome announcements**, v. 1, n. 4, p. e00519-13, 2013b.
- ROY, A.; LÉON, M.G.; STONE, A.L.; SCHNEIDER, W.L.; HARTUNG, J.S.; BRLANSKY, R.H. First report of *Citrus leprosis virus* nuclear type in sweet orange in Colombia. **Plant Disease**, v. 98, n. 8, p. 1162, 2014.
- ROY, A.; HARTUNG, J.S.; SCHNEIDER, W.L.; SHAO, J.; LEÓN, M.G.; MELZER, M.J.; BEARD, J.J.; OTERO-COLINA, G.; BAUCHAN, G.R.; OCHOA, R.; BRLANSKY, R.H. Role bending: complex relationships between viruses, hosts and vectors related to citrus leprosis, an emerging disease. **Phytopathology**, v. 105, n. 7, p. 1013-1025, 2015.
- SÁNCHEZ-VELÁZQUES, E.J.; SANTILLÁN-GALICIA, M.T.; NOVELLI, V.M.; NUNES, M.A.; MORA-AGUILERA, G.; VALDEZ-CARRASCO, J.M.; OTERO-COLINA, G.; FREITAS-ASTÚA, J. Diversity and genetic variation among *Brevipalpus* propulations from Brazil and Mexico. **PLOS One**, v. 10, n. 7, 1-16, 2015.
- SANTAMARÍA, M.E.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; MARTÍNEZ, M.; GRBIC, V.; CASTAÑERA, P.; DÍAZ, I.; ORTEGO, F. Digestive proteases in bodies and faeces of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. **Journal of Insect Physiology**, v. 78, p. 69-77, 2015.
- SANTOS, M.C.; NUNES, M.A.; SINICO, T.E.; NOVELLI, V.M. Validação de protocolo para extração de RNA total de *Brevipalpus phoenicis*, ácaro vetor da leprose dos citros. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, 38, **Summa Phytopathologica** (Supplement), v. 41, p. 081, 2015.
- SEDDAS, P.; BOISSINOT, S.; STRUB, J.M.; DORSSELAER, A.V.; VAN REGENMORTEL, M.H.V.; PATTUS, F. Rack-1, GAPDH3, and actin: proteins of *Myzus persicae* potentially involved in the transcytosis of beet western yellows virus particles in the aphid. **Virology**, v. 325, p. 399-412, 2004.
- SILVA, M.G.L.; SCARE, R.F. Comportamento de compra de defensivos agrícolas do citricultor paulista: as fontes de informação. **Revista de Administração da FATEA – RAF**, v. 10, n. 10, p. 65-79, 2015.
- STERCK, L.; BILLIAU, K.; ABEEL, T.; ROUZÉ, P.; VAN DE PEER, Y. ORCAE: online resource for community annotation of eukaryotes. **Nature Methods**, v. 9, n. 11, p. 1041, 2012.

- SUBRAMANIAN, A.; TAMAYO, P.; MOOTHA, V.K.; MUKHERJEE, S.; EBERT, B.L.; GILLETTE, M.A.; PAULOVIK, A.; POMEROY, S.L.; GOLUB, T.R.; LANDER, E.S.; MESIROV, J.P. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profile. **PNAS**, v. 102, n. 43, p. 15545-15550, 2005.
- SU, Y.L.; LI, J.M.; LI, M.; LUAN, J.B.; YE, X.D.; WANG, X.W.; LIU, S.S. Transcriptomic analysis of the salivary glands of an invasive whitefly. **PLOS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39303, 2012.
- TAMBORINDEGUY, C.; MONSION, B.; BRAULT, V.; HUNNICUTT, L.; JU, H.J.; NAKABACHI, A.; VAN FLEET, E.A genomic analysis of transcytosis in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, a mechanism involved in virus transmission. **Insect Molecular Biology**, v. 19, p. 259-272, 2010.
- TASSI, A.D.; GARITA-SALAZAR, L.C.; AMORIM, L.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W. Virus-vector relationship in the Citrus leprosis pathosystem. **Experimental and Applied Acarology**, v. 71, p. 227-241, 2017.
- TIWARI, S.; GONDHALEKART, A.D.; MANN, R.S.; SCHARF, M.E.; STELINSKI, L.L. Characterization of five CYP4 genes from Asian citrus psyllid and their expression level in *Candidatus Liberibacter asiaticus*-infected and uninfected psyllids. **Insect Molecular Biology**, v. 20, n. 6, p. 733-744, 2011a.
- TIWARI, S.; PELZ-STELINSKI, K.; MANN, R.S.; STELINSKI, L.L. Glutathione S-transferase and cytochrome P450 activity levels in *Candidatus Liberibacter asiaticus*-infected and uninfected Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, p. 297-305, 2011b.
- VAN DEN HEUVEL, J.F.J.M.; HOGENHOUT, S.A.; VAN DER WILK, F. Recognition and receptors in virus transmission by arthropods. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 71-76, 1999.
- VAN LEEUWEN, T.V.; TIRRY, L.; YAMAMOTO, A.; NAUEN, R.; DERMAUW, W. The economic importance of acaricides in the control of phytophagous mites and an update on recent acaricide mode of action research. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 12-21, 2014.
- VYAS, M.; FISHER, T.W.; HE, R.; NELSON, W.; YIN, G.; CICERO, J.M.; WILLER, M.; KIM, R.; KRAMER, R.; MAY, G.A.; CROW, J.A.; SODERLUND, C.A.; GANG, D.R.; BROWN, J.K. Asian citrus psyllid expression profile suggest *Candidatus Liberibacter asiaticus*-mediated alteration of adult nutrition and metabolism, and of nymphal development and immunity. **PLOS One**, v. 10, n. 6, p. e0130328, 2015.
- XIA, W.K.; SHEN, X.M.; DING, T.B.; NIU, J.Z.; ZHONG, R.; LIAO, C.Y.; FENG, Y.C.; DOU, W.; WANG, J.J. Functional analysis of a chitinase gene during the larval-nymph transition in *Panonychus citri* by RNA interference. **Experimental and Applied Acarology**, v. 70, n. 1, p. 1-15, 2016.

- XU, J.; DE BARRO, P.J.; LIU, S.S. Reproductive incompatibility among genetic groups of *Bemisia tabaci* supports the proposition that the whitefly is a cryptic species complex. **Bulletin of Entomological Research**, v. 100, p. 359-366, 2010.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 57-63, 2009.
- WANG, J.; ZHAO, H.; LIU, J.; JIU, M.; QIAN, Y.J.; LIU, S.S. Low frequency of horizontal and vertical transmission of two begomoviruses through whiteflies exhibits little relevance to the vector infectivity. **Annals of Applied Biology**, v. 157, p. 125-133, 2010.
- WANG, Y.; XIAO, D.; WANG, R.; LI, F.; ZHANG, F.; WANG, S. Deep sequencing-based transcriptome analysis reveals the regulatory mechanism of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) nymph parasitized by *Encarsia sophia* (Hymenoptera: Aphelinidae). **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157684, 2016.
- WANG, X.W.; LIU, S.S. Functional genomics in the whitefly *Bemisia tabaci* species complex. In: CZOSNEK, H.; GHANIM, M. (eds) **Management of Insect Pests to Agriculture**, p. 201-2014, Springer, Cham, 2016.
- WANG, W.; ZHAO, W.; LI, J.; LUO, L.; KANG, L.; CUI, F. The c-Jun N-terminal kinase pathway of a vector insect is activated by virus capsid protein and promotes viral replication. **eLIFE**, v. 6, p. e26591, 2017.
- WEEKS, A.; MAREC, F.; BREEUWER, J.A.J. A mite species that consists entirely of haploid females. **Science**, v. 292, p. 2479-2482, 2001.
- WILLNOW, T.E. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. **Journal of Molecular Medicine**, v. 77, p. 306-315, 1999.
- WHITFIELD, A.E.; ULLMAN, D.E.; GERMAN, T.L. Tospovirus-thrips interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 459-489, 2005.
- WHITFIELD, A.E.; FALK, B.W.; ROTENBERG, D. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. **Virology** (Review), v. 479, p. 278-289, 2015.
- YANG, X.; THANNHAUSER, Y.W.; BURROWS, M.; COX-FOSTER, D.; GILDOW, F.E.; GRAY, S.M. Coupling genetics and proteomics to identify aphid proteins associated with vector-specific transmission of polerovirus (*Luteoviridae*). **Journal of Virology**, v. 82, n. 1, p. 291-299, 2008.
- YANG, X.; HE, C.; XIE, W.; LIU, Y.; XIA, J.; YANG, Z.; GUO, L.; WEN, Y.; WANG, S.; WU, Q.; YANG, F.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Glutathione S-transferase are involved in thiamethoxam resistance in the field whitefly *Bemisia tabaci* Q (Hemiptera: Aleyrodidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 134, p. 73-78, 2016.

ZHANG, Z.; ZHANG, P.; LI, W.; ZHANG, J.; HUANG, F.; YANG, J.; BEI, Y.; LU, Y. *De novo* transcriptome sequencing in *Frankliniella occidentalis* to identify genes involved in plant virus transmission and insecticide resistance. **Genomics**, v. 101, p. 296-305, 2013.

ZHAO, L.; JONES, W.A. Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. **Invertebrate Survival Journal**, v. 90, p. 93-101, 2012.

ZHAO, S.; FERNALD, R.D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology**, v. 12, n. 8, p. 1045-1062, 2005.