

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

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DE *Brevipalpus yothersi***  
**RELACIONADOS COM RESPOSTA À DETOXIFICAÇÃO DE XENOBIÓTICOS E**  
**À INTERAÇÃO COM FITOVÍRUS**

**THAÍS ELISE SINICO**

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

SÃO PAULO  
2023

**THAÍS ELISE SINICO**

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DE *Brevipalpus yothersi*  
RELACIONADOS COM RESPOSTA À DETOXIFICAÇÃO DE XENOBIÓTICOS E  
À INTERAÇÃO COM FITOVÍRUS**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientadora: Dra. Juliana Freitas-Astúa

Coorientadora: Dra. Valdenice Moreira Novelli

SÃO PAULO  
2023

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

Assinatura: Thaís Elise Sinico Data: 30/11/2023

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

---

Sinico, Thaís Elise.

Análise do perfil de expressão de genes de *Brevipalpus yothersi* relacionados com resposta à detoxificação de xenobióticos e à interação com fitovírus. São Paulo. / Thaís Elise Sinico - São Paulo, 2023.

94 p.

doi: 10.31368/PGSAAA.2023T.TS07

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização e interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientadora: Juliana de Freitas-Astúa

Coorientadora: Valdenice Moreira Novelli

Versão do título para o inglês: Analysis of the expression profile of *Brevipalpus yothersi* genes related to the response to xenobiotic detoxification and plant virus interactions.

1. *Cilievirus* 2. *Dichorhavirus* 3. Interação vírus-vetor 4. VTB

I. Sinico, Thaís Elise II. Freitas-Astúa, Juliana de III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl/2023/07

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Nome:** Thaís Elise Sinico

**Título:** Análise do perfil de expressão de genes de *Brevipalpus yothersi* relacionados com resposta à detoxificação de xenobióticos e à interação com fitovírus.

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

**Aprovado em:** 25/10/2023

### Banca Examinadora

Profa. Dra. Juliana de Freitas-Astúa      Instituição: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Rosana Blawid                      Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Flávia Viana Ferreira              Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dra. Aline Daniele Tassi                      Instituição: University of Florida

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Diogo Manzano Galdeano              Instituição: Universidade Federal de Viçosa

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo (88882.444232/2019-01).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processos nº 2017/50222-0, 2019/25078-9), pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto Biológico e ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, pela oportunidade da realização do Doutorado e pelo crescimento acadêmico.

Aos professores do Instituto Biológico por todo conhecimento compartilhado, contribuindo com minha formação.

À Unidade Laboratorial de Referência em Biologia Molecular Aplicada, do Instituto Biológico, e ao Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” – IAC, pela disponibilização da infraestrutura para a realização deste trabalho.

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

À Dra. Valdenice Moreira Novelli, pela co-orientação, ensinamentos e apoio constante durante o trabalho.

À professora Dra. Rosana Blawid, à Dra. Flávia Viana Ferreira, ao professor Dr. Diogo Manzano Galdeano e ao professor Dr. Mario Eidi Sato, pelas preciosas contribuições para esse trabalho.

À Dra. Aline Tassi e à Dra. Gabriella Arena, pela disponibilidade, colaboração e contribuições enriquecedoras para esse trabalho.

Ao professor Dr. Ricardo Harakava, pela disponibilidade e auxílio no sequenciamento Sanger.

À Dra. Maria Andréia Nunes, pela amizade, ensinamentos e apoio desde a iniciação científica.

Aos amigos do Laboratório de Acarologia, Ms. Letícia Ferreira, Débora dos Santos, Luidi Augusto Silva, Lucas Zuliani, Gabriel Restani, Augusto Ferrari e Samira Duarte de Paula pela amizade e apoio durante o trabalho. Obrigada pelas incansáveis coletas de ácaros, pelos nossos cafês e momentos divertidos.

Aos amigos do grupo VTBs, Dra. Camila Chabi, Dr. Pedro Ramos-González, Ms. Mariane Rodrigues, Ms. Matheus Potsclam, Laura Rossetto, Isabela Leão e Giovanne Martinelli pelas discussões científicas, amizade e pelas tardes regadas a café e pipoca.

Aos amigos da turma de 2019 do programa de Pós-Graduação do Instituto Biológico, pelos momentos divertidos estudando, discutindo artigos e preparando o jantar no alojamento.

À Dra. Uiara Souza e Ms. Alexandre Gomes, pela amizade, apoio e aventuras por São Paulo. Vocês foram essenciais.

Às minhas amigas Paula Dias, Aline Amaral, Graziela Gomes, Sílvia Dorta e Patrícia Correa pelo carinho, apoio e incentivo em todos os momentos.

À minha família, pelo amor incondicional, em especial aos meus pais, Maria Aparecida e José João, pelo incentivo e apoio em todas as minhas decisões.

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

## RESUMO

SINICO, Thaís Elise. **Análise do perfil de expressão de genes de *Brevipalpus yothersi* relacionados com resposta à detoxificação de xenobióticos e à interação com fitovírus.** 2023. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2023.

*Brevipalpus yothersi* é vetor do citrus leprosis virus C (CiLV-C, *Cilevirus leprosis*), o agente causal da leprose, principal doença viral dos citros no Brasil e em alguns países das Américas, e do coffee ringspot virus (CoRSV, *Dichorhavirus coffeae*), patógeno da mancha anular do cafeeiro. Os sintomas típicos causados por vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTBs) são lesões localizadas ao redor do sítio de alimentação dos ácaros. Estudos de interação entre CiLV-C/hospedeira vegetal/*B. yothersi* sugerem o envolvimento de vias hormonais da planta e produção de moléculas reativas de oxigênio (ROS) na modulação do comportamento do vetor, com aumento da oviposição e colonização na hospedeira. Contudo, não há muitas informações acerca da interação *B. yothersi*/VTB. Assim, os objetivos deste trabalho foram: avaliar a expressão de genes de *B. yothersi* relacionados à detoxificação de xenobióticos, interação vírus-vetor, imunidade, estresse do retículo endoplasmático (RE) e de proteínas mal enoveladas (UPR), em resposta a CiLV-C e CoRSV; e avaliar a resposta biológica de ácaros avirulíferos (AVIR) e virulíferos (VIR), após exposição a composto xenobiótico. Os genes relacionados à detoxificação de xenobióticos e sistema imune inato (Toll e IMD/JNK) foram reprimidos em ácaros VIR para ambos os VTBs, enquanto genes da via JAK/STAT foram induzidos. Genes relacionados ao estresse do RE/UPR foram induzidos em ácaros VIR para CiLV-C, mas reprimidos em resposta ao CoRSV. Uma maior mortalidade da população VIR (ambos VTBs) foi observada após ingestão de peróxido de hidrogênio, corroborando com a repressão dos genes de detoxificação observada nas análises quantitativas. Os dados sugerem que a aquisição viral desencadeia uma resposta negativa em *B. yothersi*, tornando-os mais vulneráveis a exposição a compostos xenobióticos; porém, ocorre ativação de vias contra infecção viral para possíveis efeitos deletérios destes VTBs. A diferença na resposta da via de estresse do RE/UPR evidencia a especificidade nas interações entre *B. yothersi* e os diferentes VTBs.

**Palavras-chave:** *Cilevirus*. *Dichorhavirus*. Interação vírus-vetor. VTB.

## ABSTRACT

SINICO, Thaís Elise. **Analysis of the expression profile of *Brevipalpus yothersi* genes related to the response to xenobiotic detoxification and plant virus interactions.** 2023. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2023.

*Brevipalpus yothersi* is the vector of citrus leprosis virus C (CiLV-C, *Cilevirus leprosis*), the causal agent of citrus leprosis, the main viral disease of citrus in Brazil and in some countries of the Americas, and of coffee ringspot virus (CoRSV, *Dichorhavirus coffeae*), the causal agent of coffee ringspot disease. Typical symptoms induced by *Brevipalpus*-transmitted viruses (BTVs) are localized lesions around the feeding sites of the mites. Interaction studies between CiLV-C/plant host/*B. yothersi* suggest the involvement of the defense hormonal pathways of plant, and the production of reactive oxygen molecules (ROS) in the modulation of the vector behavior by increasing oviposition and colonization in the host. However, there is still no information about the *B. yothersi*/BTV interaction. Thus, the goals of this work were: to evaluate the expression of *B. yothersi* genes related to xenobiotic detoxification, virus-vector interaction, immunity, endoplasmic reticulum (ER) stress and unfolded protein response (UPR), in response to CiLV-C and CoRSV; and to evaluate the biological response of non-viruliferous (non-VIR) and viruliferous (VIR) mites after exposure to xenobiotic compound. Genes related to xenobiotics detoxification and innate immune system (Toll and IMD/JNK pathways) were repressed in VIR mites for both BTVs, whereas genes in the JAK/STAT pathway were induced. ER/UPR stress-related genes were induced in VIR mites for CiLV-C, but repressed in response to CoRSV. Higher mortality of the VIR population (both BTVs) was observed after ingestion of hydrogen peroxide, corroborating with the repression of the detoxification genes observed in the quantitative analyses. Data suggest that viral acquisition triggers a negative response in *B. yothersi*, making them more vulnerable to exposure to xenobiotic compounds; however, there is activation of pathways against viral infection for possible deleterious effects of these BTVs. The difference in the response of the ER/UPR stress pathway highlights the specificity in the interactions between *B. yothersi* and the different BTVs.

**Keywords:** *Cilevirus*. *Dichorhavirus*. Virus-vector interaction. BTV.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Organização do genoma de cilevirus (família *Kitaviridae*) e dichorhavirus (família *Rhabdoviridae*). Ambos possuem genoma bissegmentado com polaridades diferentes (retirado de Freitas-Astúa et al., 2018). ..... 21
- Figura 2** - Sintomas típicos de leprose dos citros: (A) lesões necróticas localizadas em ramo, (B) lesões cloróticas em folha, (C) lesões necróticas em fruto, (D) queda de frutos em decorrência da infecção viral em estágio avançado da doença, (E) depreciação total da planta (Fotos: arquivo pessoal). ..... 24
- Figura 3** - Sintomas típicos da mancha anular do cafeeiro: manchas cloróticas em forma de anéis em (A) folhas, (B) frutos e ramos. Conforme a severidade da doença (C) ocorre uma queda severa de folhas e frutos [Fotos: (A, C) arquivo pessoal; (B) retirado de Ramalho et al., 2015]. ..... 26
- Figura 4** - Ácaros (A) *B. yothersi* adquirem e inoculam VTBs durante alimentação, (B) perfurando as células vegetais com um estilete retrátil. A aquisição viral ocorre na ingestão do conteúdo celular, e a inoculação durante injeção de saliva. (C) Cilevírus e dichorhavirus são vírus persistentes e circulam no ácaro vetor. Cilevírus (círculo roxo) são encontrados somente entre as células adjacentes, e os dichorhavirus (círculo vermelho) são propagativos, ou seja, se replicam dentro do vetor [retirado de: (A) Beard et al., 2015; (B) Alberti et al., 2014b; (C) Freitas-Astúa et al., 2018].29
- Figura 5** – Representação da via de sinalização Toll e IMD em insetos. A ativação da via Toll (esquerda) inicia quando receptores reconhecem os patógenos, levando a ativação de proteases que ativam a proteína Spätzle. Esta, se liga ao receptor Toll, dando início a uma cascata de sinalização que culmina na degradação de Cactus e deslocamento dos fatores de transcrição Dif e Dorsal para o núcleo, iniciando a transcrição de peptídeos antimicrobianos. Na ausência de infecção, serpinas inibem as proteases. Para ativação da via IMD (direita), o patógeno se liga a receptores transmembrana, ocorrendo ativação da proteína Imd e início de uma cascata de sinalização que leva ao deslocamento do fator de transcrição Relish para o núcleo e regulação dos peptídeos antimicrobianos (retirado de Klowden, 2013). ..... 35
- Figura 6** - Representação da via de defesa JAK/STAT. Receptor Dome e Hop/JAK são ativados após ligação do ligante UPD. A fosforilação do complexo permite a ligação de Stat. Em seguida, Stat é fosforilado e forma dímeros que se locomovem para o núcleo, se ligando a uma sequência de DNA nos promotores dos genes-alvo, ativando sua transcrição (retirado e adaptado de Arbouzova & Zeidler, 2006). ..... 36
- Figura 7** - Representação das principais vias de imunidade relatadas em *D. melanogaster* e seus componentes em *T. urticae*. Os genes que não foram reportados em *T. urticae* estão em caixas amarelas. Genes conservados são mostrados em caixas vermelhas (retirado de Grbic et al., 2011).37
- Figura 8** – Representação da via UPR. A via é ativada através dos receptores de membrana PERK, IRE1 $\alpha$  e ATF6. (A) Em condições sem estresse, a molécula BiP se liga aos receptores para mantê-los inativos. Após um estado de estresse, BiP se dissocia dos receptores e inicia a sinalização da via UPR, sendo recrutados os fatores de transcrição ATF4, TRAF2 ou ATF6, respectivamente. (B) A via UPR é ativada em carrapatos *I. scapularis* mediante ativação do receptor IRE1 $\alpha$  e recrutamento de TRAF2, sendo o eixo responsável pela ativação alternativa da via IMD (retirado de Sidak-Loftis et al., 2022). ..... 39
- Figura 9** – Frutos de laranja doce utilizados para manutenção e multiplicação de ácaros *B. yothersi*: (A) frutos sadios para multiplicação das populações avirulíferas; (B) frutos sintomáticos para multiplicação das populações virulíferas para CiLV-C (Fotos: arquivo pessoal). ..... 41
- Figura 10** - Material vegetal para manutenção e multiplicação de ácaros *B. yothersi* avirulíferos e virulíferos para CoRSV: (A) folhas sadias de café destacadas, dispostas em bandejas sobre espuma umedecida; (B) cafeeiros para multiplicação da população virulífera; (C) folhas com manchas anelares causadas pela infecção viral (Fotos: arquivo pessoal). ..... 42
- Figura 11** - Material biológico para multiplicação das populações de ácaros: (A) ácaros *B. yothersi* avirulíferos mantidos em folhas destacadas de feijão de porco; (B) frutos de laranja doce sintomáticos para leprose usados na multiplicação de ácaros virulíferos para CiLV-C; (C) folhas de cafeeiro com sintomas causados pela infecção com CoRSV para multiplicação de ácaros virulíferos (Fotos: arquivo pessoal). ..... 47

- Figura 12** – Ilustração da entrega de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sob as diferentes concentrações, via ingestão oral em papel filtro para *B. yothersi* avirulífero e virulífero para CiLV-C ou CoRSV: (1) ácaros *B. yothersi* foram transferidos para disco de papel filtro (2 cm), disposto em placa de Petri isolada com algodão umedecido; (2) em seguida foram adicionados 40 µL da solução de peróxido de hidrogênio; (3) as placas foram vedadas com filme plástico e (4) armazenadas em sala climatizada por 24 horas, quando foi realizada a contagem dos ácaros. Ilustração criada na plataforma BioRender..... 48
- Figura 13** - Amplificação do produto da RT-PCR de amostras de ácaros *B. yothersi* mantidos em (A) frutos de laranja doce sadios e (B) frutos sintomáticos para leprose: (1-20) amostra de RNA de ácaros; (Be) controle da extração de RNA; (Bc) controle da síntese de cDNA; (-) controle negativo da PCR; (+) controle positivo para CiLV-C; (M) marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, G2101 #304492). Amplicon CiLV-C: 393 pb. Gel de agarose 0,8%. ..... 49
- Figura 14** - Amplificação do produto da RT-PCR de amostras de ácaros *B. yothersi* mantidos para multiplicação em (A) folhas destacadas de cafeeiro sadio e (B) folhas de cafeeiros com sintomas de mancha anular: (1-20) amostra de RNA de ácaros; (Be) controle da extração de RNA; (Bc) controle da síntese de cDNA; (-) controle negativo da PCR; (+) controle positivo para CoRSV; (M) marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, G2101 #304492). Amplicon CoRSV: 389 pb. Gel de agarose 0,8%. ..... 50
- Figura 15** - Amplificação dos fragmentos para oito genes validados (RT-PCR): (1, 2) amplicons obtidos a partir de amostras de cDNA de ácaros *B. yothersi*; (B) controle da PCR (reações sem cDNA); (M) marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, G2101 #304492). Gel de agarose 2%. Os demais iniciadores apresentaram o mesmo perfil de amplificação, com fragmentos únicos e do tamanho esperado. .... 50
- Figura 16** - Classificação final dos candidatos a normalizadores de acordo com programa RefFinder, comparando os valores da média geométrica (GM) atribuída para cada gene com base nos dados de estabilidade calculada pelos algoritmos. As barras verdes indicam os genes mais estáveis (menor valor GM). As barras laranjas indicam os genes menos estáveis. .... 52
- Figura 17** - Perfil de expressão dos genes associados a detoxificação de xenobióticos em ácaros *B. yothersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros avirulíferos (AVIR), mantidos em frutos sadios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros virulíferos (VIR), mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas sadias de cafeeiro. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns). .... 53
- Figura 18** - Perfil de expressão dos genes associados à detoxificação de moléculas de ROS em ácaros *B. yothersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos sadios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas sadias de cafeeiro. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns). .... 54
- Figura 19** – Perfil de expressão dos genes associados a interação vírus-vetor em ácaros *B. yothersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos sadios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas sadias de cafeeiro. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns). .... 55
- Figura 20** - Perfil de expressão gênica da quitinase 3, associado a hidrólise de quitina em ácaros *B.*

*yotherersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos sadios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas sadias de cafeeiro. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns). ..... 56

**Figura 21** – Perfil de expressão dos genes associados ao sistema imune inato - a via IMD/JNK em ácaros *B. yotherersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos sadios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas sadias de cafeeiro. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns). ..... 57

**Figura 22** - Perfil de expressão dos genes associados a via Toll em ácaros *B. yotherersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos sadios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas sadias de cafeeiro. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns). ..... 58

**Figura 23** - Perfil de expressão dos genes associados a via JAK/STAT em ácaros *B. yotherersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos sadios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas sadias de cafeeiro. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns). ..... 59

**Figura 24** - Perfil de expressão dos genes envolvidos no silenciamento de RNA em *B. yotherersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos sadios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas sadias de cafeeiro. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns). ..... 59

**Figura 25** - Perfil de expressão dos genes associados ao estresse do retículo endoplasmático (RE) e proteínas mal enoveladas (UPR) em ácaros *B. yotherersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos sadios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas sadias de cafeeiro. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns). ..... 60

**Figura 26** - Perfil de expressão dos genes associados a resposta celular em ácaros *B. yotherersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos

em frutos sadios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas sadias de cafeeiro. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns)..... 61

**Figura 27** – Mortalidade de ácaros *B. yothersi* avirulíferos e virulíferos para (A) CiLV-C e (B) CoRSV, após 24 horas de ingestão de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 1%, 3%, 5% e água como controle. Barras verdes: ácaros AVIR mantidos em folhas de feijão de porco. Barras laranjas: ácaros VIR para CiLV-C. Barras vermelhas: ácaros VIR para CoRSV. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*)...... 62

**Figura 28** – Perfil de expressão dos genes SOD e POD em *B. yothersi*. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas de feijoeiro. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das três réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. .... 63

**Figura 29** - Ilustração da interação entre *Brevipalpus yothersi* × VTBs. Os lados direito e esquerdo do ácaro, separados pela linha tracejada, apresentam as vias induzidas e reprimidas em resposta ao cilevírus CiLV-C e ao dichorhívirus CoRSV, respectivamente. Após aquisição de células vegetais contendo partículas de CiLV-C e, conseqüentemente, moléculas de ROS, os genes relacionados as vias do sistema imune inato (Imd, JNK e Toll) e o gene Vtg são reprimidos, todavia, a via de resposta à infecção viral JAK/STAT, via de UPR e o gene CRT são induzidos em resposta ao CiLV-C. Em decorrência da aquisição de partículas de CoRSV, as vias do sistema imune inato (Imd, JNK e Toll), via de UPR e o gene CRT são reprimidos, enquanto a via JAK/STAT e o gene Vtg são induzidos em resposta ao dichorhívirus. Ilustração criada na plataforma BioRender..... 72

**Figura 30** - Perfil de expressão gênica diferencial de ácaros *B. yothersi* avirulíferos (AVIR) mantidos em diferentes hospedeiras vegetais: frutos de laranja doce sadios (AVIR\_Lar), representados pelas barras verdes; folhas sadias de cafeeiro (AVIR\_Caf), representados pelas barras azuis. Os valores de *foldchange* representam a média de 20 réplicas biológicas para cada tratamento. (A) as análises de expressão foram realizadas utilizando o tratamento AVIR\_Lar como controle; (B) as análises de expressão foram realizadas utilizando o tratamento AVIR\_Caf como controle. Barras de erros representam o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns). ..... 92

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Informações dos VTBs de acordo com gênero e ácaro <i>Brevipalpus</i> spp. vetor..	19
<b>Tabela 2</b> - Informações e sequências dos iniciadores usados para detecção dos VTBs via RT-PCR. ..	43
<b>Tabela 3</b> - Informações dos genes selecionados para análise da expressão gênica de ácaros <i>B. yothersi</i> em resposta a VTBs: função ou via associada, símbolo, nome e locus no genoma. ....	44
<b>Tabela 4</b> - Sequência dos iniciadores para RT-qPCR e tamanho dos amplicons (pares de bases, pb). ..	51
<b>Tabela 5</b> - Ordenação dos genes candidatos a normalizadores de <i>B. yothersi</i> em resposta ao CoRSV ( <i>Dichorhavirus</i> ), classificados de acordo com valores de estabilidade da expressão para cada algoritmo. ....	52
<b>Tabela 6</b> - Análise de mortalidade de ácaros <i>B. yothersi</i> avirulíferos (AVIR) e virulíferos (VIR) para os VTBs (CiLV-C e CoRSV). ....	62

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
3.1 Ácaros <i>Brevipalpus</i> spp.....	18
3.2 Vírus transmitidos por ácaros <i>Brevipalpus</i> (VTBs).....	19
3.3 A citricultura e a leprose dos citros no Brasil.....	22
3.4 Cafeicultura brasileira e a mancha anular do cafeeiro.....	25
3.5 Estudos da interação entre vírus de plantas e seus artrópodes vetores.....	26
3.5.1 Interação entre vírus de plantas e insetos vetores.....	26
3.5.2 Interação entre ácaros <i>Brevipalpus yothersi</i> e VTBs.....	28
3.5.3 Sistema imune inato de artrópodes.....	33
3.5.3.1 Principais vias de sinalização.....	34
3.5.3.2 Via de resposta de proteínas mal enoveladas.....	38
3.5.3.3 Via de silenciamento de RNA.....	40
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
4.1 Estabelecimento de ácaros <i>B. yothersi</i> em diferentes hospedeiras de VTBs.....	41
4.1.1 <i>B. yothersi</i> em frutos de laranja doce sadios ou infectados com CiLV-C.....	41
4.1.2 <i>B. yothersi</i> em plantas de cafeeiro sadias ou infectadas com CoRSV.....	42
4.2 Extração de RNA total de <i>B. yothersi</i> e detecção molecular de VTB.....	42
4.3 Seleção de genes e validação dos iniciadores para RT-qPCR.....	43
4.4 Análise de expressão gênica diferencial.....	45
4.4.1 Validação da expressão gênica por RT-qPCR.....	45
4.4.2 Seleção de normalizadores para <i>B. yothersi</i> em resposta a dichorhavirus.....	46
4.5 Avaliação da resposta biológica de <i>B. yothersi</i> a composto xenobiótico.....	47
4.5.1 Entrega de peróxido de hidrogênio para <i>B. yothersi</i> via ingestão oral.....	47
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
5.1 Ácaros <i>B. yothersi</i> em diferentes hospedeiras de VTBs.....	49
5.1.1 <i>B. yothersi</i> em frutos de laranja doce sadios ou infectados com CiLV-C.....	49
5.1.2 <i>B. yothersi</i> em plantas de cafeeiro sadias ou infectadas com CoRSV.....	49
5.2 Seleção e validação de iniciadores para RT-qPCR.....	50
5.3 Análise de expressão gênica diferencial.....	51
5.3.1 Seleção de normalizadores para <i>B. yothersi</i> em resposta a dichorhavirus.....	51

5.3.2 Expressão gênica de <i>B. yothersi</i> em resposta aos VTBs .....	53
5.3.2.1 Genes associados a detoxificação de xenobióticos .....	53
5.3.2.2 Genes com potencial envolvimento na interação vírus-vetor .....	54
5.3.2.3 Genes associados ao sistema imune inato .....	56
5.4 Avaliação da resposta biológica de <i>B. yothersi</i> a composto xenobiótico .....	61
5.4.1 Entrega de peróxido de hidrogênio para <i>B. yothersi</i> via ingestão oral .....	61
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO A - Expressão gênica de ácaros <i>B. yothersi</i> avirulíferos nas diferentes hospedeiras vegetais .....</b>	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Ácaros *Brevipalpus* spp. (Tenuipalpidae) são fitófagos e possuem ampla gama de hospedeiras vegetais, incluindo culturas de importância econômica como citros, café, maracujá e diversas plantas ornamentais (RODRIGUES; CHILDERS, 2013). Algumas espécies neste gênero se destacam devido à capacidade de transmitir fitovírus (KITAJIMA et al., 2003; 2010; de LILLO et al., 2021).

Os vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* (VTBs) são classificados em citoplasmáticos ou nucleares, em decorrência do sítio de replicação nas plantas hospedeiras, sendo divididos em três gêneros: *Cilevirus* e *Higrevirus* (*Kitaviridae*, *Martellivirales*) e *Dichorhavirus* (*Rhabdoviridae*, *Mononegavirales*) (KITAJIMA et al., 1974; 1972; LOCALI-FABRIS et al., 2012; DIETZGEN et al., 2014; FREITAS-ASTÚA et al., 2018; QUITO-AVILA et al., 2020; RODRIGUES, 2021).

Apenas recentemente foi demonstrado que o higrevírus hibiscus green spot virus 2 (HGSV2), causador da clorose zonada dos citros, é transmitido por ácaros do gênero *Brevipalpus* (RODRIGUES, 2022; OLMEDO-VELARDE et al., 2023). HGSV2 foi identificado infectando plantas de hibisco e citros, causando lesões cloróticas irregulares em folhas e frutos, podendo ser transmitido experimentalmente para *Arabidopsis thaliana* por *B. yothersi* e *B. papayensis* (RODRIGUES, 2022; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2023) e para *Citrus reticulata* por *B. azores* (OLMEDO-VELARDE et al., 2023). Dentre os cilevírus, o citrus leprosis virus C (CiLV-C) é o VTB mais estudado por ser o agente causal da leprose dos citros, a principal doença de etiologia viral que acomete pomares citrícolas brasileiros, um setor com destaque mundial na produção e exportação de suco de laranja (BASTIANEL et al., 2010; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016; NEVES et al., 2020; USDA, 2022).

Ácaros *B. yothersi* são os principais vetores do CiLV-C (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016) e de outros VTBs de importância agrônômica. O dichorhavirus coffee ringspot virus (CoRSV), agente causal da mancha anular do cafeeiro, é transmitida por *B. yothersi* e *B. papayensis* (NUNES et al., 2018) e é considerada doença emergente nos pomares de café (GOODIN; FIGUEIRA, 2019), cultura brasileira que também se destaca mundialmente na produção e exportação de grãos (CONAB, 2023).

Estudos sobre interação vírus-vetor disponíveis na literatura envolvem, na maioria das vezes, resultados com insetos vetores e pouco se conhece sobre a interação de ácaros com os fitovírus. Insetos desenvolveram um mecanismo imunológico sofisticado, induzindo peptídeos antimicrobianos, que são controlados pelas principais vias de sinalização: Toll, IMD (*immune deficiency*) e JAK/STAT (*janus kinase/signal transducers and activator of*

*transcription*) (KLOWDEN, 2013). A resposta dessas vias de sinalização imune em resposta a infecções é específica para o sistema vírus-vetor. A via Toll é ativada em resposta a fungos e bactérias, enquanto a via JAK/STAT ativada em resposta a infecção viral (HE et al., 2021). Na interação entre moscas brancas e begomovírus, a via de sinalização Toll pode ser reprimida, enquanto a via de resposta antiviral é induzida (HE et al., 2021; WANG et al., 2022). No caso da via de sinalização IMD, ativada em resposta a infecções bacterianas, alguns componentes foram perdidos em alguns insetos, como pulgões, e em aracnídeos (GRBIC et al., 2011; BECHSGAARD et al., 2016), e mecanismos alternativos para a sua ativação foram sugeridos, como a via de resposta de proteínas mal enoveladas (*unfolded protein response*, UPR) (SIDAK-LOFTIS et al., 2022).

Além de ácaros *Brevipalpus* spp., eriofídeos também são importantes ácaros vetores de fitovírus, dentre eles *Aceria tosichella* Keifer (Eriophyidae), vetor do wheat streak mosaic virus (WSMV) (*Tritimovirus*, *Potyviridae*) (NAVIA et al., 2012; GUPTA et al., 2019). Nessa interação, o vírus altera o transcriptoma do ácaro vetor, desencadeando uma regulação negativa de genes envolvidos no sistema imune e detoxificação, visando prolongar a retenção viral (GUPTA et al., 2019).

A infecção por CiLV-C desencadeia respostas de defesa em *Arabidopsis thaliana* e em laranja doce (*Citrus sinensis*), através da indução de genes envolvidos na via hormonal do ácido salicílico (AS) e, de forma antagônica, da repressão da via do ácido jasmônico/etileno (AJ/ET) (ARENA et al., 2016). Quanto à interação vírus-vetor, em trabalho pioneiro, o transcriptoma da interação entre *B. yothersi* e CiLV-C permitiu, por meio da análise de genes diferencialmente expressos (GDE), identificar genes relacionados a detoxificação de xenobióticos, hidrólise de peroxidase, genes relacionados a cutícula e outros potencialmente envolvidos na interação vírus-vetor (SINICO, 2018).

Com base nestas informações, visando aprofundar na investigação e ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de resposta de *B. yothersi* aos VTBs (CiLV-C e CoRSV), este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de genes com potencial envolvimento na interação vírus-vetor, sejam eles envolvidos na detoxificação de xenobióticos ou associados ao sistema imunológico do ácaro. Ademais, foi investigado o comportamento biológico e molecular de *B. yothersi* em resposta a produto xenobiótico, como peróxido de hidrogênio.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Analisar o perfil de expressão de genes de *Brevipalpus yothersi* relacionados à detoxificação de xenobióticos e à interação com VTBs.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os genes relacionados à detoxificação e interação entre *B. yothersi* e um cilevírus (CiLV-C) e entre *B. yothersi* e um dichorhavirus (CoRSV);
- Avaliar a resposta biológica e molecular de ácaros *B. yothersi* avirulíferos e virulíferos para CiLV-C e CoRSV após entrega de composto xenobiótico;
- Propor um modelo para interação *Brevipalpus* × VTBs.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Ácaros *Brevipalpus* spp.

O gênero *Brevipalpus* Donnadieu (Tenuipalpidae) possui cerca de 300 espécies de ácaros distribuídos mundialmente. Algumas espécies são polífagas, apresentando ampla gama de hospedeiras vegetais, podendo colonizar mais de 900 espécies de plantas (MESA et al., 2009; NAVIA et al., 2013; RODRIGUES; CHILDERS, 2013; BEARD et al., 2015; CASTRO et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2023).

Ácaros deste gênero apresentam o corpo dorso-ventralmente plano, coloração avermelhada e quatro estágios ativos após a fase de ovo: larva, protoninfa, deutoninfa e adulto. Os estágios são intercalados por fases imóveis, conhecidas como protocrisálida, deutocrisálida e teliocrisálida (CHILDERS; RODRIGUES, 2011). O ciclo biológico completo pode variar de 14 a 40 dias, dependendo das condições ambientais, como temperatura e umidade (HARAMOTO, 1969; CHIAVEGATO, 1996). A reprodução por partenogênese telítica é uma peculiaridade biológica atribuída a alguns desses ácaros. Ovos não fertilizados geram fêmeas haplóides, num processo de feminilização que ocorre devido à presença de bactérias endossimbiontes do gênero *Cardinium* (WEEKS et al., 2001; GROOT; BREEUWER, 2006; KITAJIMA et al., 2014), assim, os machos são naturalmente raros e evidências anatômicas sugerem que a fertilização não é eficiente (ALBERTI et al., 2014a).

Ácaros *Brevipalpus* são importantes economicamente por serem pragas de plantas frutíferas e ornamentais, mas sua relevância maior ocorre em função da capacidade que algumas espécies possuem de transmitir vírus (CHILDERS; DERRICK, 2003; KITAJIMA et al., 2003; 2010; de LILLO et al., 2021). As espécies vetoras estão divididas em três grupos: *B. phoenicis* sensu lato (Geijskes), *B. californicus* (Banks) e *B. obovatus* Donnadieu (BEARD et al., 2015). O complexo *B. phoenicis* s.l. é composto pelas espécies: *B. azores*, *B. feresi*, *B. ferraguti*, *B. hondurani*, *B. papayensis*, *B. phoenicis* sensu stricto, *B. tucuman* e *B. yothersi*. Algumas destas espécies se destacam por estarem presentes em culturas agrícolas de importância econômica como citros, café, maracujá e ornamentais (RODRIGUES; CHILDERS, 2013; BEARD et al., 2015).

Dentre elas, *B. yothersi* é a espécie mais estudada devido à sua ampla distribuição e gama de hospedeiras vegetais, além da sua eficiência na transmissão de uma diversidade de vírus de importância agrícola (de LILLO et al., 2021), como o citrus leprosis virus C (CiLV-C) (SANCHEZ-VELAZQUEZ et al., 2015; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016; BASSANEZI et al., 2019), o citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2) (ROY et al., 2013a), o citrus chlorotic spot

virus (CiCSV) (CHABI-JESUS et al., 2018), o passion fruit green spot virus (PfGSV) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020), o clerodendrum chlorotic spot virus (CICSV) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2018a), e o coffee ringspot virus (CoRSV) (NUNES et al., 2018).

### 3.2 Vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* (VTBs)

Um crescente número de VTBs já foram identificados e isolados em diferentes plantas hospedeiras (KITAJIMA et al., 2010; GARITA et al., 2014; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2023). Os VTBs são classificados de acordo com o sítio de replicação na hospedeira vegetal e organização genômica (FREITAS-ASTÚA et al., 2018). Diferentemente da maioria dos vírus de plantas, os VTBs não são sistêmicos, ou seja, não circulam pelos vasos condutores da planta, resultando em sintomas restritos ao redor do local de alimentação do ácaro vetor em condições naturais de campo (FREITAS-ASTÚA et al., 2018).

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses), o gênero *Cilevirus* possui sete espécies aceitas, enquanto o *Dichorhavirus* possui cinco espécies aceitas e uma espécie tentativa (Tabela 1).

**Tabela 1** - Informações dos VTBs de acordo com gênero e ácaro *Brevipalpus* spp. vetor.

Vírus (acrônimo)	Espécie	Vetor	Referência
<b><i>Cilevirus</i></b>			
Citrus leprosis virus C (CiLV-C)	<i>Cilevirus leprosis</i>	<i>B. yothersi</i> <i>B. papayensis</i>	Ramos-González et al., 2016; Nunes et al., 2018
Citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2)	<i>Cilevirus colombiaense</i>	<i>B. yothersi</i>	Roy et al., 2013a; Roy et al., 2015
Passion fruit green spot virus (PfGSV)	<i>Cilevirus passiflorae</i>	<i>B. yothersi</i>	Ramos-González et al., 2020
Hibiscus yellow blotch virus (HYBV)	<i>Cilevirus oahuense</i>	<i>B. yothersi</i> <sup>1</sup>	Olmedo-Velarde et al., 2021b
Solanum violifolium ringspot virus (SvRSV)	<i>Cilevirus solani</i>	<i>B. obovatus</i>	Ramos-González et al., 2022
Ligustrum leprosis virus (LigLV)	<i>Cilevirus australis</i>	<i>B. tucuman</i>	Ramos-González et al., 2022
Ligustrum chlorotic spot virus (LigCSV)	<i>Cilevirus ligustri</i>	<i>B. papayensis</i>	Ramos-González et al., 2022
<b><i>Dichorhavirus</i></b>			
Orchid fleck virus (OFV)	<i>Dichorhavirus orchidaceae</i>	<i>B. californicus</i>	Ramalho et al., 2014
Coffee ringspot virus (CoRSV)	<i>Dichorhavirus coffeae</i>	<i>B. papayensis</i> <i>B. yothersi</i>	Nunes et al., 2018
Clerodendrum chlorotic spot virus (CICSV)	<i>Dichorhavirus clerodendri</i>	<i>B. yothersi</i>	Ramos-González et al., 2018a
Citrus leprosis virus N (CiLV-N)	<i>Dichorhavirus leprosis</i>	<i>B. phoenicis</i> s.s.	Ramos-González et al., 2017
Citrus chlorotic spot virus (CiCSV)	<i>Dichorhavirus citri</i>	<i>B. yothersi</i>	Chabi-Jesus et al., 2018
Citrus bright spot virus (CiBSV)	<i>Dichorhavirus australis</i> <sup>2</sup>	<i>B. azores</i>	Chabi-Jesus et al., 2023

<sup>1</sup>sem dados biológicos de transmissão

<sup>2</sup>espécie tentativa

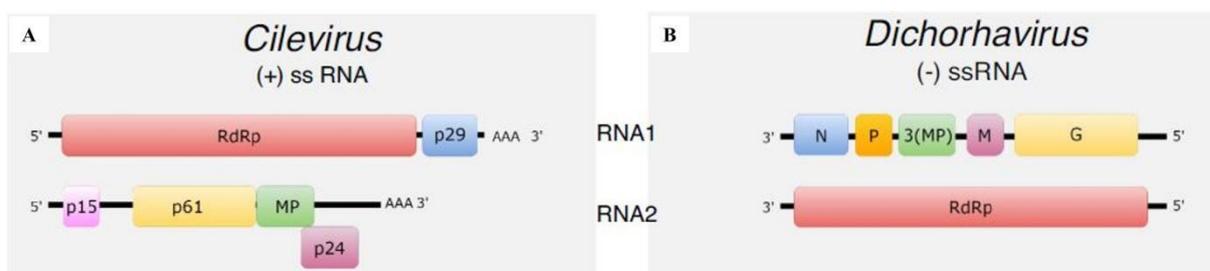
Os cilevírus apresentam genoma bissegmentado de RNA fita simples de sentido positivo [RNAss (+)] (Figura 1A), partículas envelopadas baciliformes curtas de 60-70 nm de largura e 120-150 nm de comprimento, sendo localizadas isoladas ou agrupadas no lúmen do retículo endoplasmático das células vegetais infectadas. Os viroplasmas ocorrem como inclusões citoplasmáticas elétrons-densas e vacuoladas (KITAJIMA et al., 2003; LOCALI-FABRIS et al., 2012; FREITAS-ASTÚA et al., 2018). O RNA1 apresenta duas ORFs (*open reading frames*), que codificam as proteínas: polimerase RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase*) e p29 (proteína do capsídeo). O RNA2 contém quatro ORFs, que codificam as proteínas: p15, p61 (putativa glicoproteína), MP (proteína de movimento) e p24 (putativa proteína estrutural), tendo uma região intergênica situada entre as ORFs p15 e p61 (LOCALI-FABRIS et al., 2012; RAMOS-GONZALEZ et al., 2016). Ainda que as proteínas p15, p61 e p24 não possuam funções definidas, a p15 pode estar envolvida na supressão de silenciamento de RNA (LEASTRO et al., 2020). Ademais, a p61 é responsável pela indução de morte celular e ativação de genes relacionados a respostas de defesa vegetal, evidenciando o seu envolvimento em resposta similar à hipersensibilidade em plantas infectadas por CiLV-C (ARENA et al., 2020). Além de CiLV-C e CiLV-C2 infectarem citros, o CiLV-C2 infecta naturalmente *Swinglea glutinosa*, *Dieffenbachia* sp. e hibisco na Colômbia (ROY et al., 2015), além de hibisco no Havaí (MELZER et al., 2013) e na Flórida (ROY et al., 2018), e maracujazeiro no Havaí (OLMEDO-VELARDE et al., 2022).

O PfGSV apresenta uma ampla gama de hospedeiras naturais, todas elas relatadas no Brasil (KITAJIMA et al., 1997; ANTONIOLI-LUIZON et al., 2009; RAMOS-GONZALEZ et al., 2020; da COSTA-RODRIGUES et al., 2022) e, recentemente, encontrado na Colômbia (ROY et al., 2023). A principal espécie hospedeira deste vírus, no entanto, é o maracujazeiro, cultura nativa e de importância econômica para o Brasil, o maior produtor mundial desta fruta (ALTENDORF, 2018; INCAPER, 2023). O PfGSV causa a pinta verde do maracujazeiro, cujos sintomas típicos são caracterizados por manchas cloróticas verdes nos frutos e ao longo das nervuras das folhas, surgindo principalmente quando estas se encontram em estado de senescência, além de lesões cloróticas e/ou necróticas em ramos (ANTONIOLI-LUIZON et al., 2009; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020). Diferente dos demais cilevírus, PfGSV apresenta no RNA2 uma ORF que codifica uma proteína de 13 kDa (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020).

O hibiscus yellow blotch virus (HYBV), pertencente à espécie *Cilevirus oahuense*, foi relatado infectando hibisco apenas no Havaí (OLMEDO-VELARDE et al., 2021b). Espécies ornamentais, como ligustro (*Ligustrum sinense*) e solano (*Solanum violifolium*), são afetados

por ligustrum chlorotic spot virus (LigCSV, *Cilevirus ligustri*), ligustrum leprosis virus (LigLV, *Cilevirus australis*) e solanum violifolium ringspot virus (SvRSV, *Cilevirus solani*), respectivamente (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2022). Ácaros *B. papayensis* transmitem LiCSV para ligustro e, experimentalmente, para *A. thaliana*; em folhas de ligustro infectadas com LigLV foram encontrados ácaros *B. tucuman*, sendo o primeiro relato dessa espécie como possível vetor de vírus, porém, novos experimentos são necessários para confirmação; já *B. obovatus* pode transmitir SvRSV (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2022; 2023).

Os dichorhavirus por sua vez apresentam genoma bissegmentado de RNA fita simples de sentido negativo [RNAss (-)] (Figura 1B), com partículas não-envelopadas baciliformes de 40-50 nm de largura e 100-110 nm de comprimento, presentes no núcleo e citoplasma das células vegetais infectadas, apresentando viroplasmas elétron-transparentes no núcleo, formando estruturas típicas conhecidas como “roda de carroça” (DIETZGEN et al., 2014; 2018; KONDO et al., 2017). O RNA1 tem cinco ORFs, que codificam as proteínas: N (nucleocapsídeo), P (fosfoproteína), MP (proteína de movimento), M (proteína da matrix) e G (glicoproteína), enquanto o RNA2 apresenta somente o gene que codifica a RdRp, conhecida como proteína L (DIETZGEN et al., 2014). Orchid fleck virus (OFV, espécie *Dichorhavirus orchidaceae*), reportado inicialmente no Japão, possui distribuição mundial, provavelmente devido ao comércio ilegal de orquídeas. O vírus é transmitido exclusivamente por *B. californicus* (DOI et al., 1977; KONDO et al., 2003; DIETZGEN et al., 2018).



**Figura 1** - Organização do genoma de cilevirus (família *Kitaviridae*) e dichorhavirus (família *Rhabdoviridae*). Ambos possuem genoma bissegmentado com polaridades diferentes (retirado de Freitas-Astúa et al., 2018).

Os dichorhavirus citrus leprosis virus N (CiLV-N), CiCSV e citrus bright spot virus (CiBSV, espécie tentativa *Dichorhavirus australis*) também produzem sintomas associados a leprose no Brasil. O CiLV-N é encontrado em pomares não comerciais, em regiões frias e altitude elevada, e é transmitido por ácaros *B. phoenicis* s.s. (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017). CiCSV foi relatado em citros e hibisco, e tem como vetor *B. yothersi* ou *B. aff. yothersi* (CHABI-JESUS et al., 2018), enquanto o vetor de CiBSV é *B. azores* (CHABI-

JESUS et al., 2023).

CoRSV é o agente causal da mancha anular do cafeeiro e foi primeiramente reportado em 1938 no interior do estado de São Paulo (BITANCOURT, 1938), mas somente na década de 1970 suas partículas virais foram observadas em microscopia eletrônica de transmissão (KITAJIMA; COSTA, 1972). A cafeicultura é um setor de importância econômica para o Brasil, e a presença de CoRSV é preocupante, pois o vírus se encontra estabelecido na maioria das regiões produtoras de café do país (GOODIN; FIGUEIRA, 2019), e essa incidência pode resultar em grandes prejuízos ao setor.

Plantas ornamentais do gênero *Clerodendrum*, muito usadas em parques e jardins urbanos no Brasil, também são afetadas por VTBs (KITAJIMA et al., 2008). Essas plantas são acometidas pelo dichorhavirus ClCSV, agente causal da mancha clorótica do *Clerodendrum*, que leva ao aparecimento de manchas cloróticas e necróticas em folhas e ramos (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2018a). O ClCSV também pode ser transmitido mecanicamente para algumas hospedeiras experimentais, se tornando sistêmico em *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa* mantidas em altas temperaturas (28°C - 29°C) (KITAJIMA et al., 2008), e tem como vetor *B. yothersi* (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2018a).

### 3.3 A citricultura e a leprose dos citros no Brasil

A citricultura é um dos principais setores do agronegócio brasileiro, sendo o Brasil responsável por 79% da produção mundial de suco de laranja (NEVES; TROMBIN, 2017; NEVES et al., 2020; CITRUSBR, 2023a). O produto é comercializado para potências econômicas como EUA, China, Japão e Austrália, mas tem na Europa o seu maior mercado, o qual retém mais de 66% da produção brasileira (CITRUSBR, 2023a).

A estimativa da safra 2023/2024 para as principais regiões citrícolas do país (São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro) apresentou uma produção total de 309,34 milhões de caixas de laranja de 40,8 kg (CITRUSBR, 2023b; FUNDECITRUS, 2023a). Todavia, a produtividade do setor sofre perdas significativas devido a problemas fitossanitários, o que demanda gastos elevados com o uso de defensivos agrícolas para controle de pragas e vetores, além de fatores climáticos, que também podem contribuir para a queda prematura dos frutos (NEVES et al., 2020; MOREIRA et al., 2022). Além das condições climáticas, observadas durante as três últimas safras, que contribuíram com a queda prematura de 21% dos frutos, pragas e doenças foram responsáveis pela perda de quase 65 milhões de caixas (MOREIRA et al., 2022; FUNDECITRUS, 2023a; 2023b).

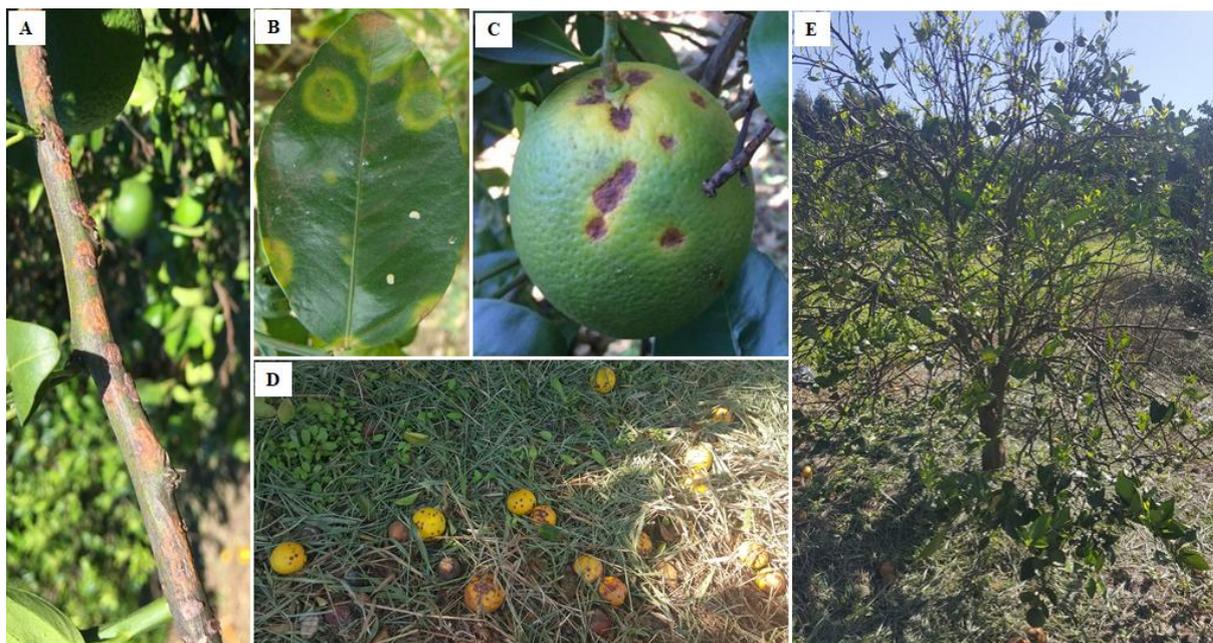
Dentre as pragas e doenças, a leprose dos citros, causada principalmente pelo citrus

leprosis virus C (CiLV-C), acomete a maioria dos pomares de citros no Brasil tendo sido a responsável pela queda prematura de ~ 2% dos frutos na última safra 2022/2023 (FUNDECITRUS, 2023b). O principal vetor da leprose nos pomares comerciais é o ácaro *B. yothersi* (BASTIANEL et al., 2006; BEARD et al., 2015; ROY et al., 2015a; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016; FERREIRA et al., 2020). Porém, experimentalmente, já foi demonstrado que *B. papayensis* também é capaz de transmitir o CiLV-C (NUNES et al., 2018).

A leprose é uma doença viral atípica, não sistêmica, cujos sintomas são caracterizados por lesões cloróticas e/ou necróticas restritas ao sítio de alimentação dos ácaros, como folhas, frutos e ramos (BASTIANEL et al., 2006) (Figura 2), que se deve a uma interação incompatível desencadeada por respostas do tipo hipersensibilidade (HR-like) (ARENA et al., 2016; 2020). Conforme a severidade dos sintomas e falhas no manejo, pode ocorrer a depreciação dos pomares, afetando a vida útil da planta e levando-a à morte (BASTIANEL et al., 2006; 2010; ROY et al., 2015a). Estes sintomas típicos de leprose podem ser atribuídos aos cilevírus CiLV-C (LOCALI-FABRIS et al., 2006) e CiLV-C2 (ROY et al., 2013a), bem como aos dichorhavirus CiLV-N, CiCSV, orchid fleck virus (OFV-citrus) e CiBSV (KITAJIMA et al., 1972; ROY et al., 2013b; 2014; CHABI-JESUS et al., 2018; 2023).

O CiLV-C infecta citros no Brasil, porém, não há relatos do CiLV-C2 no país, sendo encontrado nessa hospedeira apenas na Colômbia (ROY et al., 2013a; 2014). Dentre os dichorhavirus, o CiLV-N é encontrado no estado de São Paulo, em regiões de maiores altitudes e baixas temperaturas; o CiCSV foi reportado apenas no estado do Piauí (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017; CHABI-JESUS et al., 2018) e o CiBSV relatado nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (CHABI-JESUS et al., 2023). Por outro lado, o OFV foi identificado em citros na Colômbia, México, África do Sul e Havaí (EUA) (ROY et al., 2014; 2015b; COOK et al., 2019; OLMEDO-VELARDE et al., 2021a).

O CiLV-C é o agente causal prevalente da leprose no Brasil e apresenta três linhagens caracterizadas: CRD (Cordeirópolis), SJP (São José do Rio Preto) e ASU (Assunção, Paraguai), sendo a primeira distribuída em praticamente toda a América Latina, a segunda encontrada exclusivamente em pomares do cinturão citrícola brasileiro (SP/MG) e a terceira encontrada, até o momento, apenas em uma amostra herborizada de 1937 mantida no Instituto Biológico de São Paulo (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016; 2018b; CHABI-JESUS et al., 2021).



**Figura 2** - Sintomas típicos de leprose dos citros: (A) lesões necróticas localizadas em ramo, (B) lesões cloróticas em folha, (C) lesões necróticas em fruto, (D) queda de frutos em decorrência da infecção viral em estágio avançado da doença, (E) depreciação total da planta (Fotos: arquivo pessoal).

Além do Brasil, a leprose dos citros também é relatada em outros países das Américas, como Argentina, Paraguai, Bolívia, Colômbia, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Honduras, Guatemala, México e Belize (BASTIANEL et al., 2010; RODRIGUES; CHILDERS, 2013; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016). O CiLV-C já foi identificado em cerca de 48 espécies de hospedeiras experimentais e duas naturais: *Swinglea glutinosa* e *Commelina benghalensis* (LÉON et al., 2008; NUNES et al., 2012; GARITA et al., 2014).

Dentro do gênero *Citrus*, CiLV-C infecta várias espécies, porém, com diferentes graus de suscetibilidade: laranjas doces (*C. sinensis*) são altamente suscetíveis, tangerinas (*C. reshni* Tanaka, *C. reticulata* Blanco, *C. deliciosa* Tenore) são intermediárias, enquanto os limões (*C. limon* L. Osbeck) e limas (*C. aurantifolia* Swingle) são tolerantes e/ou resistentes (BASTIANEL et al., 2006; 2010).

Como o CiLV-C é um vírus de caráter não sistêmico, a presença do ácaro vetor e a existência de plantas infectadas são condições obrigatórias para a disseminação da doença nos pomares (BASSANEZI et al., 2019) e o conhecimento de todos os fatores envolvidos é de extrema importância para o seu manejo. O controle da doença é primariamente realizado com uso de acaricidas, gerando gastos em torno de US\$ 54 milhões/ano (BASSANEZI et al., 2019). Contudo, a diversidade de ingredientes ativos é baixa, e o uso constante do mesmo produto e combinações com outros pesticidas, visando a reduzir os custos no controle de outras pragas em citros, podem causar ineficiência e seleção de populações resistentes

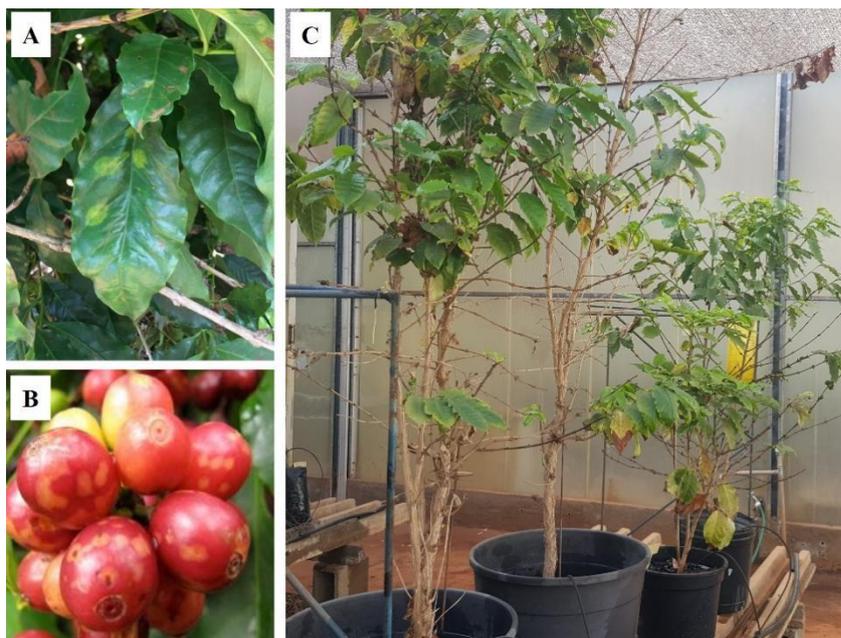
(LEEuwEN et al., 2015; ANDRADE et al., 2018; BASSANEZI et al., 2019; DELLA VECHIA et al., 2018; 2019; 2021a). Estudos sugerem inclusive que a redução na eficiência de controle do acaricida, pela combinação de produtos químicos, decorre do antagonismo causado por uma modulação da atividade de genes relacionados à detoxificação (DELLA VECHIA et al., 2018).

### **3.4 Cafeicultura brasileira e a mancha anular do cafeeiro**

A cafeicultura também é um setor de grande importância econômica, sendo o Brasil o maior produtor e exportador mundial de grãos, seguido pelo Vietnã e a Colômbia (FAO, 2023). A área brasileira destinada à cultura do café é de 2,26 milhões de hectares, com safra de 2023 estimada em 37,435 milhões de sacas de grãos de café (CONAB, 2023). Minas Gerais é o principal estado cafeeiro, apresentando uma produção de aproximadamente 27,5 milhões de sacas de grãos. Outros estados que se destacam na produção são Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Roraima e Paraná. Os principais destinos do grão brasileiro são Estados Unidos e Alemanha, seguidos por Itália, Bélgica e Japão (CONAB, 2023).

Assim como outras grandes monoculturas, a cafeicultura é afetada por diversos patógenos, como fungos, bactérias, nematoides e vírus. A doença de etiologia viral com potencial importância para o setor brasileiro é a mancha anular do cafeeiro, causada pelo CoRSV (BOARI, 2011). O dichorhavirus CoRSV foi primeiramente relatado em Minas Gerais, em 1938, e hoje se encontra disseminado na maioria dos estados do Brasil (RODRIGUES et al., 2002; BOARI, 2011; RAMALHO et al., 2015; GOODIN; FIGUEIRA, 2019). Há um relato da presença do vírus na Costa Rica (RODRIGUES et al., 2002), mas a sua ocorrência é extremamente rara (VILLALOBOS & FREITAS-ASTÚA, dados não publicados).

Como demais VTBs, a sintomatologia típica da mancha anular do cafeeiro é caracterizada por manchas localizadas cloróticas em forma de anéis concêntricos nas folhas e manchas amareladas nos frutos, anéis verdes evidentes em folhas senescentes, e queda severa de folhas e frutos (BOARI, 2011; KITAJIMA et al., 2011; RAMALHO et al., 2015; GOODIN; FIGUEIRA, 2019) (Figura 3) e a doença afeta a qualidade da bebida devido a um aumento dos compostos fenólicos e açúcares (BOARI et al., 2006; BOARI, 2011).



**Figura 3** - Sintomas típicos da mancha anular do cafeeiro: manchas cloróticas em forma de anéis em (A) folhas, (B) frutos e ramos. Conforme a severidade da doença (C) ocorre uma queda severa de folhas e frutos [Fotos: (A, C) arquivo pessoal; (B) retirado de Ramalho et al., 2015].

O CoRSV é transmitido pelos ácaros *B. papayensis* e *B. yothersi* (NUNES et al., 2018) e pode infectar experimentalmente plantas suculentas (*Kalanchoe tomentosa* e *Cotyledon tomentosa*) (NUNES et al., 2022), além de maracujazeiro (MASCARENHAS et al., 2009), *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *C. quinoa*, *Tetragonia expansa*, *Alternanthera tenella*, *Nicotiana tabacum* e *Gomphrena globosa* (BOARI, 2011). Pode ser transmitido mecanicamente para *C. quinoa* e *C. amaranticolor* (BOARI, 2011). Em condições experimentais, CoRSV pode se tornar sistêmico em *C. quinoa* e *N. benthamiana* em altas temperaturas (BOARI et al., 2003; 2004; RAMALHO et al., 2014; GOODIN; FIGUEIRA, 2019).

O controle da doença é realizado com uso de acaricidas, sendo recomendadas duas aplicações: uma após a colheita dos grãos e outra após o aparecimento dos primeiros frutos (BOARI, 2011).

### 3.5 Estudos da interação entre vírus de plantas e seus artrópodes vetores

#### 3.5.1 Interação entre vírus de plantas e insetos vetores

A interação entre vírus e seus vetores depende muito do modo de transmissão. A transmissão pode ser não persistente, semi-persistente ou persistente. Vírus não persistentes ficam retidos no estilete do vetor; semi-persistentes são internalizados ao se ligarem no intestino anterior; enquanto os persistentes são retidos nos tecidos, circulam pelo corpo do

inseto vetor e invadem as glândulas salivares. Vírus persistentes são divididos entre circulativos não-propagativos e persistentes propagativos (DIETZGEN et al., 2016). O modo de transmissão também depende do período de tempo que o vetor retém as partículas virais até o momento da inoculação, podendo durar de minutos a horas, dias a semanas, e podendo ocorrer ou não transmissão transovariana (IFTIKHAR et al., 2023).

Vírus transmitidos de maneira persistente circulativa atravessam diversas barreiras no interior do vetor, sendo necessário o transporte de partículas virais do trato digestivo, ultrapassando a membrana do intestino para chegarem até hemocele e, assim, alcançando as glândulas salivares para a transmissão durante a alimentação (BLANC et al., 2014; WHITFIELD et al., 2015; DÁDER et al., 2017; IFTIKHAR et al., 2023). Vírus persistentes circulativos como luteovírus, geminivírus e nanovírus necessitam de um período de retenção longo para facilitar sua transmissão (DIETZGEN et al., 2016). No caso de luteovírus, podem ser translocados por transcitose, onde as partículas virais ingeridas são transportadas pelo canal alimentar e interagem com moléculas da superfície epitelial do intestino do vetor para serem absorvidas por endocitose. Por fim, alcançam a hemocele, sendo liberados por exocitose, e atravessam as membranas das glândulas salivares para transmissão (DIETZGEN et al., 2016).

Na interação do inseto vetor *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) com tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) (*Begomovirus*, *Geminiviridae*), e de afídeos com pea enation mosaic virus (PEMV) (*Enamovirus*, *Solemoviridae*), ocorre o envolvimento de proteínas codificadas tanto pelo inseto vetor quanto pelo vírus, incluindo receptores específicos para facilitar a aquisição e transmissão viral (LINZ et al., 2015; ROSEN et al., 2015). Estudos mostraram que TYLCV interage com as proteínas “cyclophilin B” (CypB) e “heat shock protein 70” (HSP70) de *B. tabaci*, e proteínas produzidas por bactérias simbiotes, como a GroEL-like (ROSEN et al., 2015; GOROVITS; CZOSNEK, 2017; KANAKALA et al., 2019; GHOSH; GHANIM, 2021). Estudos demonstraram que CypB e HSP70 interagem com o TYLCV, sendo ambos co-localizados nas células epiteliais do intestino médio do inseto vetor, e auxiliam na transmissão viral e, após silenciamento gênico, há diminuição na transmissibilidade do vírus (GOROVITS; CZOSNEK, 2017; KANAKALA et al., 2019). A proteína de membrana “alanyl aminopeptidase N” (APN), presente no intestino do pulgão *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae), vetor do PEMV, foi o primeiro receptor em vetor identificado até o momento (LINZ et al., 2015). Ensaios de imunodeteção por “far-Western blotting” e imunofluorescência foram utilizados para caracterizar a interação da APN com a proteína da capa (CP) do PEMV (LINZ et al., 2015).

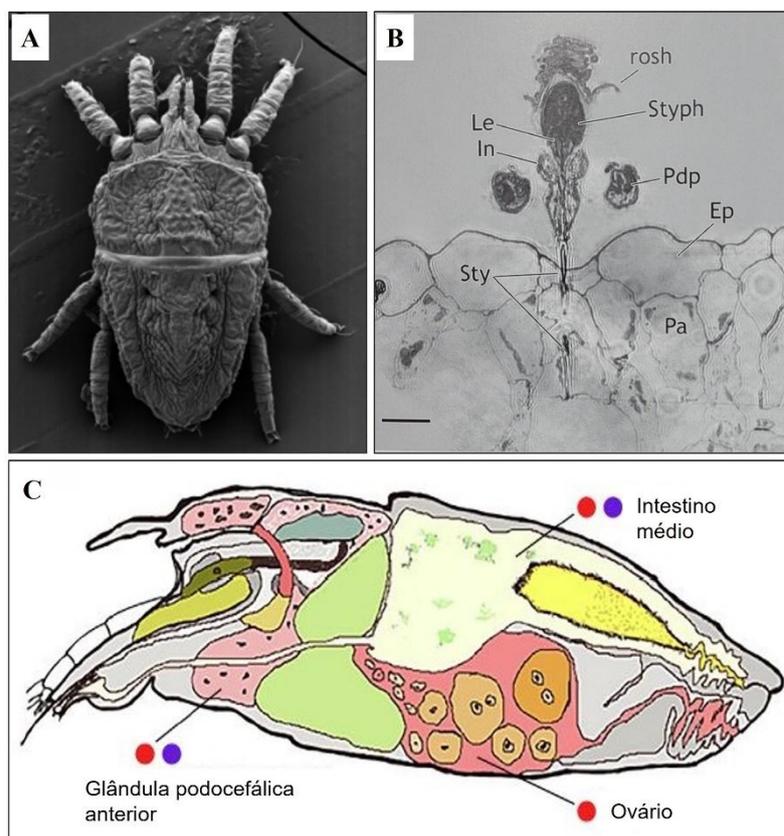
Em vírus transmitidos de maneira persistente propagativa, como rhabdovírus, tospovírus, tenuivírus e reovírus, a especificidade vírus-vetor é maior. Além da presença de receptores no vetor para facilitar a aquisição viral, o vírus é capaz de replicar no interior das células do seu vetor, os quais se tornam infectivos ao longo do seu ciclo de vida, podendo, em alguns casos, ocorrer transmissão transovariana (WHITFIELD et al., 2018). No caso de rhabdovírus e tospovírus, glicoproteínas podem interagir com receptores presentes no intestino dos insetos vetores, porém, estudos são escassos (IFTIKHAR et al., 2023). Estudos de interação proteína-proteína relataram possíveis interações entre a glicoproteína G dos rhabdovírus maíze mosaic virus (MMV) (*Alphanucleorhabdovirus*, *Rhabdoviridae*) e maíze fine streak virus (MFSV) (*Gammanucleorhabdovirus*, *Rhabdoviridae*) com receptores celulares de seus vetores *Peregrinus maidis* (Hemiptera: Delphacidae) e *Graminella nigrifrons* (Homoptera: Cicadellidae), respectivamente, visando facilitar a captação e circulação de partículas virais (WHITFIELD et al., 2018). As glicoproteínas Gn e Gc do tospovírus tomato spotted wilt virus (TSWV) (*Orthotospovirus*, *Bunyavirales*, *Tospoviridae*) facilitam a entrada no intestino médio de *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) (DIETZGEN et al., 2016). O tenuivírus rice stripe virus (RSV) (*Tenuivirus*, *Phenuiviridae*) codifica uma glicoproteína (NSvc2) que atua como componente auxiliar na interação com as células do intestino do inseto vetor *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae), facilitando circulação por endocitose e transmissão viral (LU et al., 2019).

### 3.5.2 Interação entre ácaros *Brevipalpus yothersi* e VTBs

O tipo de interação cilevírus-ácaro ainda é incerto. Ácaros *B. yothersi* (Figura 4A) adquirem e inoculam as partículas virais nas hospedeiras através da alimentação. Os ácaros perfuram a célula vegetal com o seu estilete retrátil (Figura 4B) e injetam a saliva, ocorrendo uma pré-digestão do conteúdo celular. Em seguida, eles retraem os estiletos e ingerem o conteúdo extravasado contendo as partículas virais. A inoculação viral na hospedeira sadia ocorre através da injeção da saliva contaminada (ALBERTI et al., 2014b).

Ensaio sobre os parâmetros biológicos da transmissão de CiLV-C por *B. yothersi* demonstraram que o período de aquisição e inoculação são estimados em quatro e duas horas, respectivamente, com um período de latência de sete horas, e todos os estágios ativos do ácaro são capazes de adquirir e inocular o CiLV-C, mas sem passagem transovariana (TASSI et al., 2017). Com base nestes dados, poderíamos inferir que a relação *B. yothersi*/CiLV-C seria do tipo persistente circulativa (não propagativa). Contudo, Roy et al. (2015a) detectaram RNA antígeno (fragmentos da fita complementar) de CiLV-C em ácaros, sugerindo que a

transmissão seria do tipo persistente propagativa. No entanto, não foi descartada a possibilidade de detecção de fases replicativas do vírus de material vegetal, a partir de restos de alimentação do ácaro, ou a possibilidade de ter ocorrido pareamento inespecífico dos iniciadores utilizados na detecção por RT-PCR.



**Figura 4** - Ácaros (A) *B. yothersi* adquirem e inoculam VTBs durante alimentação, (B) perfurando as células vegetais com um estilete retrátil. A aquisição viral ocorre na ingestão do conteúdo celular, e a inoculação durante injeção de saliva. (C) Cilevírus e dichorhavirus são vírus persistentes e circulam no ácaro vetor. Cilevírus (círculo roxo) são encontrados somente entre as células adjacentes, e os dichorhavirus (círculo vermelho) são propagativos, ou seja, se replicam dentro do vetor [retirado de: (A) Beard et al., 2015; (B) Alberti et al., 2014b; (C) Freitas-Astúa et al., 2018].

Trabalhos em desenvolvimento pelo nosso grupo de pesquisa conseguiram detectar o RNA antígeno até 21 dias depois dos ácaros serem retirados da fonte de inóculo, apontando para uma possível replicação de CiLV-C em *B. yothersi* (ARENA et al., 2023; TASSI et al., dados não publicados). Por outro lado, análises histológicas, via microscopia eletrônica de transmissão, não identificaram a presença de viroplasmata e partículas virais dentro das células dos ácaros, sendo observados VTBs somente em regiões intercelulares do ceco e no sistema gastrovascular do ácaro (KITAJIMA; ALBERTI, 2014; FREITAS-ASTÚA et al., 2018). Tais resultados dão suporte para uma relação do tipo persistente circulativa (Figura 4C). Porém, não excluem a possibilidade de uma transmissão persistente propagativa, pois

CiLV-C circula pelo ácaro vetor e sua carga viral se mantém constante, sugerindo uma replicação no ácaro, embora de maneira pouco eficiente ou em uma região específica de células ainda não estabelecida (TASSI et al., dados não publicados). Foi proposta a hipótese de que o movimento de cilevírus dentro de *B. yothersi* seria via paracelular, onde proteínas codificadas pelo vírus seriam reconhecidas por receptores transmembranares presentes no epitélio do ceco, desencadeando uma desorganização do complexo juncional, permitindo a passagem das partículas virais do lúmen do intestino médio até o duto salivar (de LILLO et al., 2021; TASSI et al., 2022).

Já os dichorhavirus são, provavelmente, transmitidos de maneira persistente propagativa (Figura 4C), com replicação viral dentro do ácaro vetor, sendo necessário um período de latência maior para que ocorra a transmissão (DIETZGEN et al., 2018; FREITAS-ASTÚA et al., 2018). Partículas virais e viroplasmas foram encontrados em ácaros virulíferos para OFV, CiLV-N, CICSV e CoRSV, e a citopatologia similar à observada em células vegetais infectadas foi observada nas células do epitélio do intestino e na glândula prossomal anterior do ácaro vetor (KITAJIMA; ALBERTI, 2014; DIETZGEN et al., 2018). Poucos trabalhos foram realizados para entender a interação entre dichorhavirus e ácaros vetores. Estudos da interação entre OFV-*B. californicus* evidenciaram que o período de latência do vírus no vetor é de aproximadamente duas semanas, sendo adultos e ninfas (exceto larvas) capazes de transmiti-lo. A citopatologia encontrada nas células dos ácaros apresentou semelhança com a de plantas infectadas com OFV, incluindo a presença de viroplasmas, o que indica uma transmissão do tipo persistente propagativa (KONDO et al., 2003; KITAJIMA, ALBERTI, 2014).

A interação CICSV-*B. yothersi* também foi explorada por estudos biológicos e moleculares. Partículas virais foram observadas em vesículas no citoplasma de células de *B. yothersi*, apresentando o formato de bastonete e inclusões nucleares elétron-transparentes, semelhantes ao observado em plantas de *Clerodendrum* infectadas (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2018a; TASSI et al., 2020). Ensaios dos parâmetros biológicos da transmissão mostraram que todas as fases ativas de *B. yothersi* foram capazes de adquirir CICSV com um período de acesso de aquisição mínimo de quatro horas. Porém, somente adultos e ninfas foram capazes de inocular o vírus, em um período de inoculação de uma hora. O período de latência foi de aproximadamente oito dias, ficando retido no ácaro por 26 dias (TASSI et al., 2020). Ensaios moleculares detectaram moléculas de RNA antígeno-mico nas fases ativas dos ácaros, consolidando as evidências de que a relação entre *B. yothersi* e CICSV é persistente propagativa (TASSI et al., dados não publicados).

Nos últimos anos, a peculiar interação entre CiLV-C/*B. yothersi*/plantas hospedeiras têm sido muito estudada (ARENA et al., 2016; 2018; 2020). Essa interação é mediada por vias hormonais da hospedeira vegetal, induzida pela presença de CiLV-C e/ou pela presença de *B. yothersi* (ARENA et al., 2016). A infestação de ácaros avirulíferos em *A. thaliana* e laranjeira doce (*C. sinensis*) gera um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) ao redor do local de alimentação de *B. yothersi*, além de regular as respostas de defesa da planta, como as vias hormonais do ácido salicílico (AS) e do ácido jasmônico (AJ) (ARENA et al., 2016; 2018). A partir do momento em que as plantas são infestadas com ácaros virulíferos para CiLV-C, ocorre uma reprogramação transcricional, desencadeando a via do AS, produção e acúmulo intenso de ROS, e morte celular ao redor das lesões localizadas (uma resposta similar à de hipersensibilidade ou HR-like). Todavia, as vias mediadas pelo ácido jasmônico/etileno (AJ/ET) e genes relacionados ao metabolismo primário são reguladas negativamente na presença do vírus (ARENA et al., 2016; 2018; 2020).

Acredita-se que CiLV-C estaria manipulando as defesas das plantas para favorecer a colonização de *B. yothersi*, uma vez que a oviposição é significativamente maior quando os ácaros são mantidos em plantas sintomáticas, levando à hipótese de que o CiLV-C atuaria como um efetor, desencadeando modificações no metabolismo da planta (ARENA et al., 2016; 2020). De maneira similar, já foi descrito um outro vírus com atuação efetora, o simbionte acyrthosiphon pisum virus (APV), presente nas glândulas salivares e células epiteliais do intestino do pulgão *A. pisum*. O APV é inoculado horizontalmente em hospedeiras de baixa aptidão durante a alimentação do pulgão e, apesar de não ser um vírus infectante para o inseto ou para a planta, sua presença desencadeia uma repressão nos níveis hormonais da via do ácido jasmônico (AJ-Ile) e ativação da via do ácido salicílico (AS), beneficiando a sobrevivência de *A. pisum* nas hospedeiras (LU et al., 2020).

A análise pioneira do transcriptoma do ácaro *B. yothersi* em resposta à presença do CiLV-C evidenciou que algumas famílias de genes responsáveis pelos processos de detoxificação, oxidação-redução e algumas quitinases foram os mais diferencialmente expressos na população de ácaros virulíferos (SINICO, 2018). Dentre os genes diferencialmente expressos (GDEs), se destacaram aqueles relacionados ao processo de detoxificação de xenobióticos (compostos químicos exógenos como pesticidas ou compostos secundários da planta) (AMEZIAN et al., 2021; LU et al., 2021), como as monooxigenases do citocromo P450 (CYP450).

O processo de detoxificação de xenobióticos ocorre em três fases: (I) modificação da substância exógena em um composto solúvel e menos tóxico; (II) transformação do composto

modificado na fase I, sendo conjugado com moléculas de açúcar ou glutathione, aumentando sua solubilidade; (III) os conjugados da fase II são transportados para fora da célula, com auxílio de transportadores celulares (BAJDA et al., 2015; LEEUWEN; DERMAUW, 2016; AMEZIAN et al., 2021; LU et al., 2021). Os genes CYP450 e esterases, requisitados na fase I, desempenham um papel essencial no metabolismo de compostos endógenos e detoxificação de xenobióticos, estando intimamente associados ao desenvolvimento de resistência de artrópodes a pesticidas e fitoquímicos (GRBIC et al., 2011; LEEUWEN; DERMAUW, 2016; LU et al., 2021).

Algumas hipóteses sobre o que teria desencadeado a expressão diferencial de genes relacionados à detoxificação no transcriptoma de *B. yothersi* em resposta ao CiLV-C foram levantadas: (i) seria uma resposta devido a doses sub-ótimas de produtos nos frutos utilizados para manutenção e multiplicação das populações de ácaros; todavia, os frutos foram coletados em pomares orgânicos de manejo idêntico, tanto para as áreas sem leprose quanto nas áreas com alto índice de leprose; (ii) sabendo que os ácaros têm preferência por folhas sintomáticas, poderiam ter ingerido ROS presentes nas áreas lesionadas; ou (iii) seriam induzidos devido a um efeito direto do vírus que, de alguma forma, depende totalmente do ácaro para a sua disseminação.

A produção de ROS é uma das respostas de defesa da planta contra herbivoria. As principais moléculas produzidas são o radical superóxido ( $\text{OH}^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), dióxido singleto ( $^1\text{O}_2$ ) e o radical hidroxila (HO). Enzimas protetoras como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), polifenol oxidase (PPO) e ascorbato peroxidase (APX) estão envolvidas na detoxificação dessas moléculas, e a indução destas está intimamente relacionada à resistência das hospedeiras vegetais aos artrópodes herbívoros (LU et al., 2017). O gene SOD atua como primeira linha de defesa contra essas moléculas, e sua ação resulta na formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que são decompostas em água e oxigênio pelas enzimas CAT e POD (LU et al., 2017).

No patossistema leprose dos citros, a produção de ROS é intensificada na resposta contra a colonização de CiLV-C e, dada a preferência dos ácaros por folhas sintomáticas, acredita-se que estes poderiam ingerir essas moléculas durante a alimentação (ARENA et al., 2016). A indução de genes relacionados aos processos de detoxificação é esperada para artrópodes polífagos. Contudo, a maioria dos estudos com artrópodes vetores de vírus discorrem sobre insetos. O primeiro transcriptoma de um ácaro vetor de fitovírus publicado foi com *A. tosichella* e os resultados encontrados sugerem que a aquisição de WSMV teria uma influência negativa sobre o vetor, reprimindo a maioria dos genes relacionados ao

sistema imunológico e respostas oxidativas (GUPTA et al., 2019). A inibição desses genes beneficiaria o WSMV, prolongando seu tempo de retenção dentro do ácaro vetor e aumentando a sua transmissibilidade. O vírus também induz alterações no desenvolvimento do eriofídeo, levando a uma maturação reprodutiva precoce, visando expandir a população de ácaros (GUPTA et al., 2019). O tipo de transmissão do WSMV parece ser persistente circulativa, com partículas virais encontradas no trato digestivo de *A. tosicHELLa*. A taxa de fecundidade do ácaro é aumentada quando mantidos em plantas infectadas com WSMV, mas os possíveis efeitos da resposta da planta na biologia do ácaro ainda são pouco estudados (de LILLO et al., 2018; GUPTA et al., 2019).

### 3.5.3 Sistema imune inato de artrópodes

A defesa imunológica contra patógenos infecciosos é mediada pela imunidade adquirida e inata. Na imunidade adquirida, ou adaptativa, ocorre a interação de receptores com antígenos, o que resulta na produção de anticorpos. Após nova exposição ao patógeno, a resposta imune é mais rápida devido à memória imunológica. Contudo, na imunidade inata não há necessidade de uma interação antígeno-anticorpo (ABBAS, 2012).

Artrópodes estão propensos ao ataque de uma diversidade de patógenos infecciosos. Porém, não produzem anticorpos específicos, ou seja, não possuem sistema imune adaptativo, e sua defesa imunológica é baseada em um sistema inato eficiente, com a produção de peptídeos antimicrobianos, proteínas inibidoras, e reações celulares e humorais (KLOWDEN, 2013). A resposta celular é decorrente da ação dos hemócitos, responsáveis pelo reconhecimento de corpos estranhos na hemolinfa, iniciando processos como fagocitose, nodulação e encapsulação. Na resposta humoral ocorre a síntese dos peptídeos antimicrobianos, sintetizados no corpo gorduroso e liberados na hemolinfa durante a infecção (KLOWDEN, 2013; KUMAR et al., 2018). O mecanismo de defesa é baseado no reconhecimento do agente infeccioso (peptideoglicanos e lipopolissacarídeos da parede bacteriana ou glucanos de fungos), denominados padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), por receptores de reconhecimento padrão (PRR). Os PRRs ativam repostas imunes como fagocitose, encapsulamento ou eliminação do patógeno por peptídeos antimicrobianos e/ou moléculas efetoras, como lisozimas (BECHSGAARD et al., 2016; KUMAR et al., 2018). Genes que codificam para expressão desses peptídeos são controlados pelas três principais vias de sinalização: Toll, IMD e JAK/STAT (KLOWDEN, 2013).

Entretanto, algumas peculiaridades são observadas em ácaros. Estes, não apresentam órgãos fundamentais para o sistema imune, como túbulos de Malpighi, hemolinfa e corpo

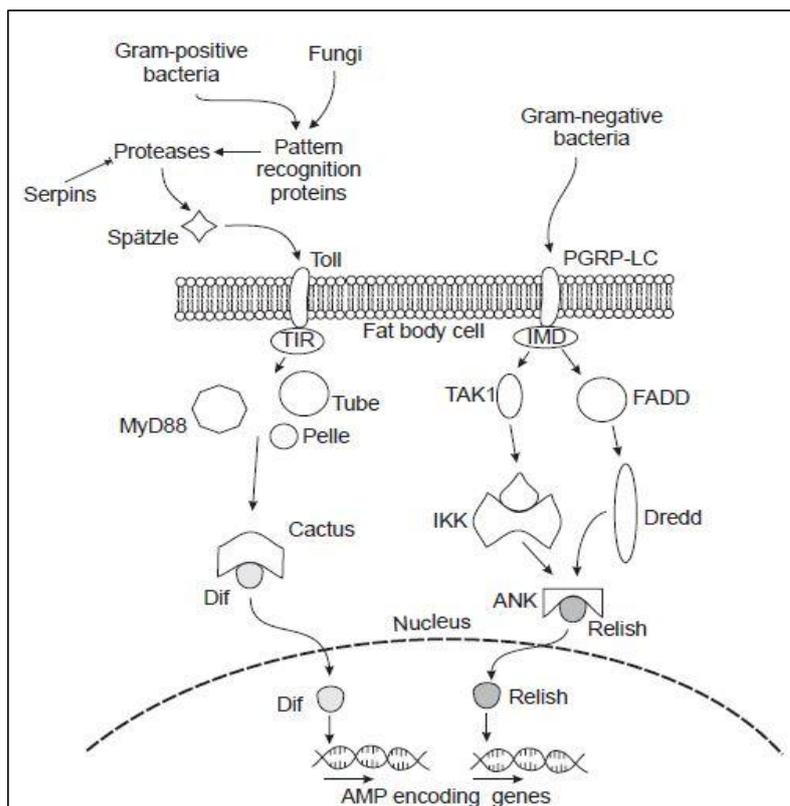
gorduroso (ALBERTI; COONS, 1999; ZELE et al., 2019). Contudo, apresentam hemócitos, os quais reconhecem a presença de patógenos, e realizam fagocitose e encapsulação (ALBERTI; COONS, 1999). O corpo gorduroso é fundamental para produção dos peptídeos antimicrobianos. Esse órgão está presente em ácaros das subordens Acaridida e Oribatida, mas em Prostigmatas a presença é variável (ALBERTI et al., 2014b). No caso do ácaro modelo *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), o corpo gorduroso foi confundido com as glândulas de teia; já em ácaros da família Tenuipalpidae, como ácaros *Brevipalpus*, o órgão não foi identificado, mas pequenas e densas inclusões lipídicas foram observadas em alguns tecidos epiteliais (ALBERTI et al., 2014b). Os autores sugerem que essas inclusões poderiam compensar a ausência do corpo gorduroso.

### 3.5.3.1 Principais vias de sinalização

A via de sinalização Toll atua contra fungos e bactérias. Moléculas presentes na parede dos patógenos levam a ativação da proteína circulante inativa Spätzle que, após ação de serina-proteases, é clivada, se torna ativa e se liga ao receptor transmembrana Toll. Receptores Toll sofrem dimerização e mudanças conformacionais, e recrutam moléculas adaptadoras como a MyD88. A molécula MyD88 se liga ao domínio TIR (*Toll/IL-1R homology*) do receptor e recruta a molécula adaptadora Tube. Em seguida, ocorre uma ligação das proteínas Pelle/Pellino, que induzem a fosforilação de proteínas Cactus/Cactin, que estão ligados aos fatores de transcrição Dif (*dorsal-related immune factor*) e Dorsal. Essas proteínas são fosforiladas e degradadas, liberando os fatores Dif e Dorsal, que são transportados para o núcleo e atuam na transcrição de peptídeos antimicrobianos (Figura 5) (KLOWDEN, 2013; RHODES; MICHEL, 2017; LEE et al., 2019; HE et al., 2021).

A molécula adaptadora Tube e o fator de transcrição Dif não tiveram homólogos encontrados em aracnídeos (GRBIC et al., 2011; PALMER et al., 2015).

Via de sinalização IMD é ativada em defesa contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. As proteínas de reconhecimento de peptídeoglicanos (PGRP) são ativadas e interagem com a proteína Imd, iniciando a via de sinalização. O fator Tak1 estimula o complexo IKK, que induz a ativação de Ankyrin (ANK) ao fator de transcrição Relish. Após clivagem, Relish se desloca para o núcleo e induz a produção de vários peptídeos antimicrobianos (Figura 5) (KLOWDEN, 2013; RHODES; MICHEL, 2017). Alguns componentes da via IMD foram perdidos em aracnídeos, como os componentes a montante (*upstream*) Imd, FADD e Dredd, assim como uma família de moléculas de reconhecimento (GRBIC et al., 2011; PALMER et al., 2015; BECHSGAARD et al., 2016; LEE et al., 2019).



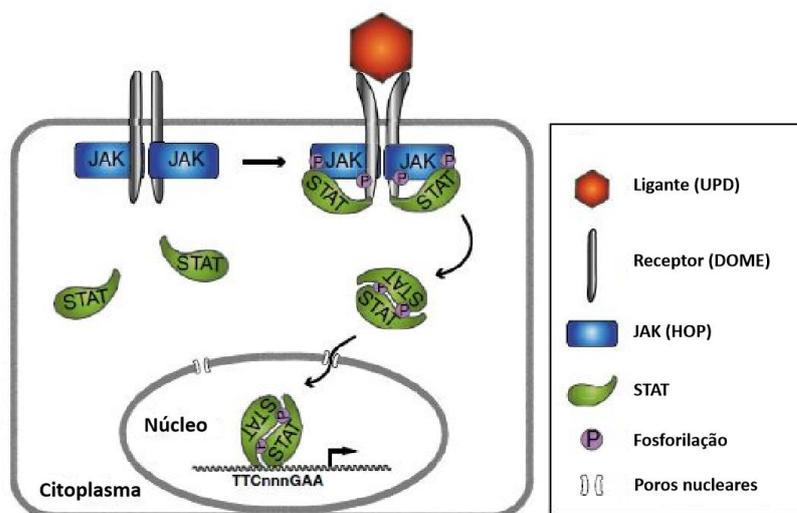
**Figura 5** – Representação da via de sinalização Toll e IMD em insetos. A ativação da via Toll (esquerda) inicia quando receptores reconhecem os patógenos, levando a ativação de proteases que ativam a proteína Spätzle. Esta, se liga ao receptor Toll, dando início a uma cascata de sinalização que culmina na degradação de Cactus e deslocamento dos fatores de transcrição Dif e Dorsal para o núcleo, iniciando a transcrição de peptídeos antimicrobianos. Na ausência de infecção, serpinas inibem as proteases. Para ativação da via IMD (direita), o patógeno se liga a receptores transmembrana, ocorrendo ativação da proteína Imd e início de uma cascata de sinalização que leva ao deslocamento do fator de transcrição Relish para o núcleo e regulação dos peptídeos antimicrobianos (retirado de Klowden, 2013).

Outras vias de sinalização são conhecidas, como a via JNK (*Jun N-terminal kinase*) e a via JAK/STAT. A via JNK é regulada pela infecção por bactérias e vírus, e é ativada pelo fator Tak1, que também é responsável pela ativação da via IMD. Tak1 ativa as moléculas sinalizadoras Hemipterous (Hep) e Basket, que leva à indução do fator de transcrição Kayak (BECHSGAARD et al., 2016).

Em *Drosophila melanogaster*, JNK participa de vários processos, além de imunidade, como desenvolvimento e apoptose (BECHSGAARD et al., 2016). Apesar do pouco conhecimento sobre o seu papel na defesa de artrópodes, foi relatado que o tenuivírus rice stripe virus (RSV) ativa a via JNK da cigarrinha *Laodelphax striatellus* para facilitar sua replicação. RSV estimula um aumento na produção da proteína sinalizadora TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) e diminui a produção da proteína supressora da via GPS2 (*G protein pathway suppressor 2*). Assim, sua proteína do capsídeo (CP) se liga à proteína GPS2, impedindo a inibição da via JNK, e as partículas virais invadem o corpo do inseto por

endocitose e se replicam (WANG et al., 2017).

A via de sinalização JAK/STAT é desencadeada em resposta a infecções virais. Sua ativação é iniciada pela ligação de citocinas de família não-pareada (UPD) ao receptor de superfície celular Domeless (Dome). O receptor Dome é dimerizado, permitindo a fosforilação da tirosina quinase Hopscotch (Hop/JAK) que, por sua vez, se torna ativa e fosforila Dome formando o complexo Dome/Hop. Este complexo se liga ao fator de transcrição Stat92E, que sofre fosforilação e se transloca para o núcleo (Figura 6), expressando genes que regulam proliferação celular, desenvolvimento e imunidade (ARBOUZOVA; ZEIDLER, 2006; KINGSOLVER et al., 2013; CHENG et al., 2016; RHODES; MICHEL, 2017; LEE et al., 2019; WANG et al., 2022). Essa via atua ativamente na defesa de *B. tabaci* contra efeitos deletérios do begomovírus TYLCV, reprimindo o acúmulo viral no inseto vetor (WANG et al., 2022). Em contrapartida, TYLCV bloqueia a translocação do fator de transcrição para o núcleo, através da ligação entre CP e Stat, ocasionando a repressão da via e, conseqüentemente, o aumento na eficiência da transmissão viral (WANG et al., 2022).



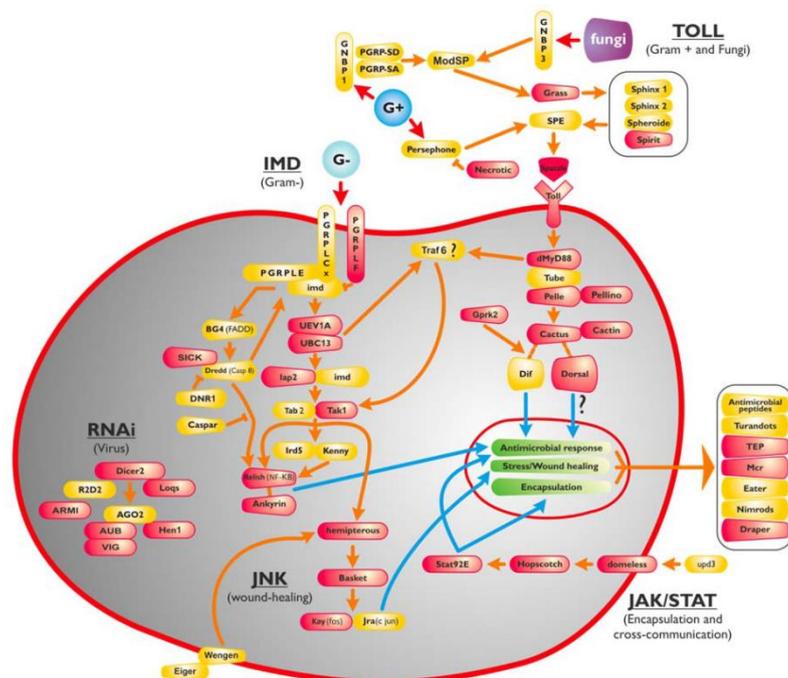
**Figura 6** - Representação da via de defesa JAK/STAT. Receptor Dome e Hop/JAK são ativados após ligação do ligante UPD. A fosforilação do complexo permite a ligação de Stat. Em seguida, Stat é fosforilado e forma dímeros que se locomovem para o núcleo, se ligando a uma sequência de DNA nos promotores dos genes-alvo, ativando sua transcrição (retirado e adaptado de Arbouzova & Zeidler, 2006).

Praticamente todo o conhecimento acerca do sistema imunológico de artrópodes deriva de estudos com *D. melanogaster*. No entanto, sabe-se que alguns componentes, principalmente da via IMD, foram perdidos em aracnídeos e em insetos hemimetábolos (GRBIC et al., 2011; BECHSGAARD et al., 2016, SIDA-K-LOFTIS et al., 2022). Todavia, algumas moléculas de sinalização são ativadas mediante infecção, como as enzimas

conjugadoras Iap2, UBC2, Uev1a, Sick e o fator de transcrição Relish, os quais auxiliam na restrição de alguns patógenos de carrapatos *Ixodes scapularis*. Nesse caso, estudos com carrapatos têm relatado que alguns componentes da via IMD podem ser induzidos através de outros mecanismos (SIDAK-LOFTIS et al., 2022).

A anotação do genoma do ácaro *T. urticae* identificou uma pequena parcela dos genes envolvidos na imunidade inata, sendo encontrados apenas 35 genes descritos para as vias IMD/JNK, Toll, JAK/STAT, silenciamento de RNA e resposta celular (Figura 7), uma parte significativamente menor em relação aos genes descritos em *D. melanogaster* (GRBIC et al., 2011).

Alguns estudos observaram que após infecção bacteriana, a taxa de mortalidade dos ácaros *T. urticae* é aumentada, indicando que as bactérias tiveram acesso à cavidade corporal, uma vez que a cutícula e epitélio intestinal são permeáveis (ZÉLÉ et al., 2019). Os autores também observaram um aumento da oviposição, sugerindo que seria uma forma de compensação provocada pela infecção. Como esses ácaros se alimentam de uma ampla gama de hospedeiras vegetais, sugerem que sua resposta imune é amparada por uma base genética diferenciada ou tetraniquídeos não apresentam resposta imune antibacteriana (SANTOS-MATOS et al., 2017; ZÉLÉ et al., 2019).



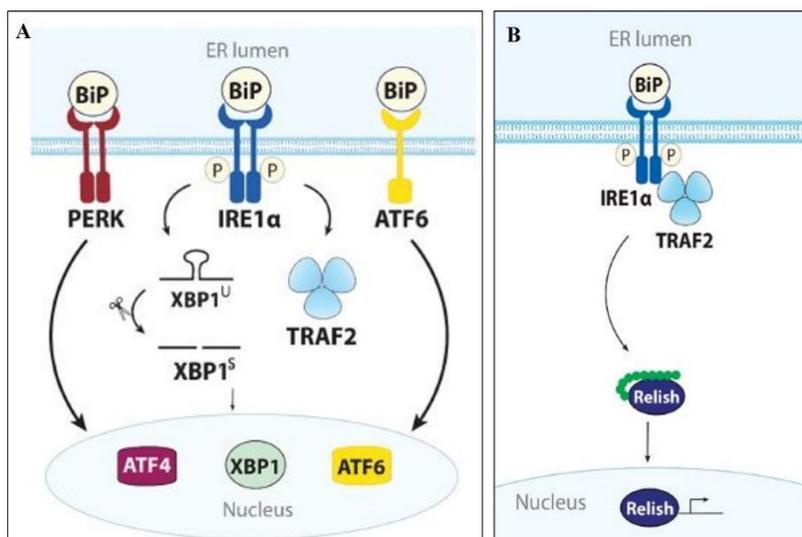
**Figura 7** - Representação das principais vias de imunidade relacionadas em *D. melanogaster* e seus componentes em *T. urticae*. Os genes que não foram reportados em *T. urticae* estão em caixas amarelas. Genes conservados são mostrados em caixas vermelhas (retirado de Grbic et al., 2011).

### 3.5.3.2 Via de resposta de proteínas mal enoveladas

A resposta de proteínas mal enoveladas (*unfolded protein response*, UPR) é uma via de resposta ao estresse altamente conservada entre eucariotos, e é ativada quando o retículo endoplasmático (RE) sofre estresse, por exemplo, por uma infecção (LI et al., 2013). A via UPR é regulada por receptores transmembrana IRE1 $\alpha$  (*inositol-requiring enzyme 1*), PERK (*pancreatic ER kinase PKC-like ER kinase*) e ATF6 (*activating transcription factor 6*) (LI et al., 2013; ROSCHE et al., 2021; JASSAR; GHANIM, 2023). Em condições normais e sem estresse, a molécula sensora BiP (*binding immunoglobulin protein*) mantém os receptores inativos; quando RE está sob estresse, BiP se dissocia dos receptores e inicia a sinalização da via (LI et al., 2013; SIDAK-LOFTIS et al., 2022).

Quando IRE1 $\alpha$  é ativado, ele se autofosforila e emenda o RNAm Xbp1 (*X-box binding protein 1*), que é traduzido e funciona como um fator de transcrição, ou leva à sinalização do TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor-2*). O receptor transmembrana PERK, quando ativado, se autofosforila e, em seguida, fosforila a molécula regulatória eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$* ), que induz a expressão do fator de transcrição ATF4. O receptor ATF6 contém um fator de transcrição bZIP dentro do domínio citosólico e, após dissociação da molécula BiP, é transportado por vesículas para dentro do compartimento de Golgi, onde é processado por proteases, ocorrendo a clivagem da sua porção N-terminal, e o fator de transcrição bZIP é translocado para o núcleo (Figura 8A) (ROSCHE et al., 2021; SIDAK-LOFTIS et al., 2022).

Em carrapatos foi sugerido que o eixo de sinalização IRE1 $\alpha$ -TRAF2 (Figura 8B) restringe a colonização e replicação das bactérias *Borrelia burgdorferi* e *Anaplasma phagocytophilum*, e funciona como um mecanismo alternativo de ativação da via IMD (SIDAK-LOFTIS et al., 2022). Os autores demonstraram que a sinalização central é ativada independentemente dos reguladores a montante (*upstream*) da via.



**Figura 8** – Representação da via UPR. A via é ativada através dos receptores de membrana PERK, IRE1 $\alpha$  e ATF6. (A) Em condições sem estresse, a molécula BiP se liga aos receptores para mantê-los inativos. Após um estado de estresse, BiP se dissocia dos receptores e inicia a sinalização da via UPR, sendo recrutados os fatores de transcrição ATF4, TRAF2 ou ATF6, respectivamente. (B) A via UPR é ativada em carrapatos *I. scapularis* mediante ativação do receptor IRE1 $\alpha$  e recrutamento de TRAF2, sendo o eixo responsável pela ativação alternativa da via IMD (retirado de Sidak-Loftis et al., 2022).

A UPR pode aumentar a capacidade da maquinaria ERAD (*ER-associated protein degradation*), a qual é responsável pela degradação das proteínas mal enoveladas (PRASAD; GREBER, 2021; JASSAR; GHANIM, 2023). A via ERAD ocorre em quatro etapas: (1) reconhecimento e translocação das proteínas mal enoveladas para fora do lúmen do RE; (2) formação de um complexo de translocação e direcionamento; (3) em seguida, enzimas associadas a membranas realizam a ubiquitinação dessas proteínas, para posterior (4) degradação por proteassomos (JASSAR; GHANIM, 2023).

A bactéria *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLso) é transmitida pelo psílido *Bactericera trigonica* (Hemiptera: Psylloidea) (SARKAR; GHANIM, 2022; JASSAR; GHANIM, 2023) e utiliza o RE do intestino do seu vetor como sítio de replicação. Estudo do transcriptoma de *B. trigonica*, após aquisição de CLso, evidenciou a indução de genes envolvidos na via ERAD, como ubiquitinas ligases, derlin-1 e selenoprotein-1, os quais participam na montagem do complexo de translocação (terceira etapa da via) (JASSAR; GHANIM, 2023). Os autores demonstraram que o derlin-1, responsável pela translocação de proteínas pelas membranas do RE, tem um importante papel na transmissão de CLso, pois, uma vez silenciado, a persistência e transmissão da bactéria por *B. trigonica* foram afetadas. Esse parece ser o primeiro exemplo de UPR sendo induzida por fitopatógenos em seus artrópodes vetores, mas certamente é uma linha de pesquisa que precisa ser mais bem explorada.

### 3.5.3.3 Via de silenciamento de RNA

A via de silenciamento de RNA é um importante mecanismo de defesa antiviral controlado por RNA reguladores, denominados interferentes (RNAi), presente em animais, plantas e fungos (KUMAR et al., 2018; LEE et al., 2019; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ; WAYNE, 2020). Três vias de RNAi foram caracterizadas: siRNA (pequenos RNAs interferentes) gerados a partir de RNAs dupla-fita (dsRNA) exógenos; miRNA (micro-RNAs), gerados a partir de transcrições codificadas por células; e piRNA (*PIWI-interacting RNA*) que são transcritos do genoma celular (KINGSOLVER et al., 2013; LEE et al., 2019). A principal via de silenciamento em insetos, e essencial para controle da replicação viral, é a via de siRNA (KINGSOLVER et al., 2013; KUMAR et al., 2018; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ; WAYNE, 2020).

A via de siRNA é ativada por uma endonuclease RNase III (Dicer), associada a proteína R2D2. O complexo Dicer-R2D2 reconhece o dsRNA viral (intermediário de replicação) e realiza a clivagem dessas moléculas, gerando RNAs interferentes de pequeno tamanho (*small interfering RNAs* - siRNAs), geralmente de 20 a 25 nucleotídeos. Os siRNAs são guiados para um complexo multiproteico, denominado complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-induced silencing complex* - RISC), com auxílio de proteínas Argonautas (AGO), e processados em cadeias fitas simples senso e anti-senso. A fita senso é degradada, enquanto a fita anti-senso é incorporado ao complexo RISC, e atua como fita molde para o reconhecimento e degradação de RNAs mensageiros, resultando no silenciamento (KINGSOLVER et al., 2013; KUMAR et al., 2018; LEE et al., 2019; KIETZ et al., 2022).

Estudos relataram que as enzimas Dicer 1 (DCL1) é requerida para produção dos miRNAs, enquanto DCL2 é necessária no processamento de dsRNA para geração de siRNAs (KINGSOLVER et al., 2013; PALMER et al., 2015; KIETZ et al., 2022). Através da análise do genoma de *T. urticae*, comparado à *Drosophila*, foram encontrados dois homólogos de DCL2, sete homólogos de AGO e cinco RdRp, necessárias para amplificação de sinais de silenciamento (GRBIC et al., 2011; NIU et al., 2018). A proteína R2D2, cofator de DCL2, não teve homólogos mas sim para cofator Loquacious (GRBIC et al., 2011).

Com a disponibilidade do genoma de *B. yothersi* (NAVIA et al., 2019), buscas de genes participantes da via siRNA foram realizadas no banco de dados e não foram encontrados homólogos para DCL2 e R2D2, somente dois homólogos para AGO2, e ainda dois homólogos RdRp, bem como outros genes da via miRNA (Drosha, Pasha, Loquacious) (NUNES & NOVELLI, dados não publicados).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

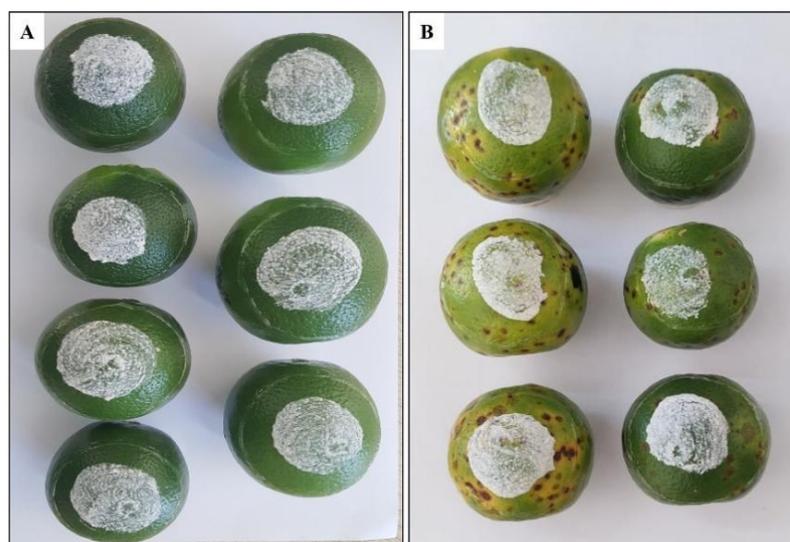
### 4.1 Estabelecimento de ácaros *B. yothersi* em diferentes hospedeiras de VTBs

#### 4.1.1 *B. yothersi* em frutos de laranja doce sadios ou infectados com CiLV-C

As populações de ácaros *B. yothersi* avirulíferos foram mantidas para multiplicação em frutos de laranja doce sadios (Figura 9A), enquanto ácaros virulíferos foram multiplicados em frutos de laranja doce sintomáticos (Figura 9B).

Os frutos usados para manutenção das populações foram lavados com água e sabão neutro e, em seguida, foi realizada lavagem adicional com “Veggie Wash® - Fruit and Vegetable Wash” (Beaumont Products, Inc., Kennesaw, GA, EUA), produto utilizado para a eliminação de resíduos químicos. Após secagem, os frutos foram parcialmente parafinados, deixando uma arena circulada com cola entomológica para evitar a fuga dos ácaros. Nesta arena foi pincelada uma mistura de farinha de trigo, areia, gesso (1:2:1) e água, com a finalidade de simular abrigo e favorecer a oviposição e multiplicação dos ácaros (RODRIGUES et al., 2007). As populações de ácaros foram mantidas em sala climatizada, com controle de temperatura ( $25^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa (UR – 70% a 80%) e fotoperíodo de 12/12 horas, no Laboratório de Acarologia do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, em Cordeirópolis – SP (CCSM – IAC).

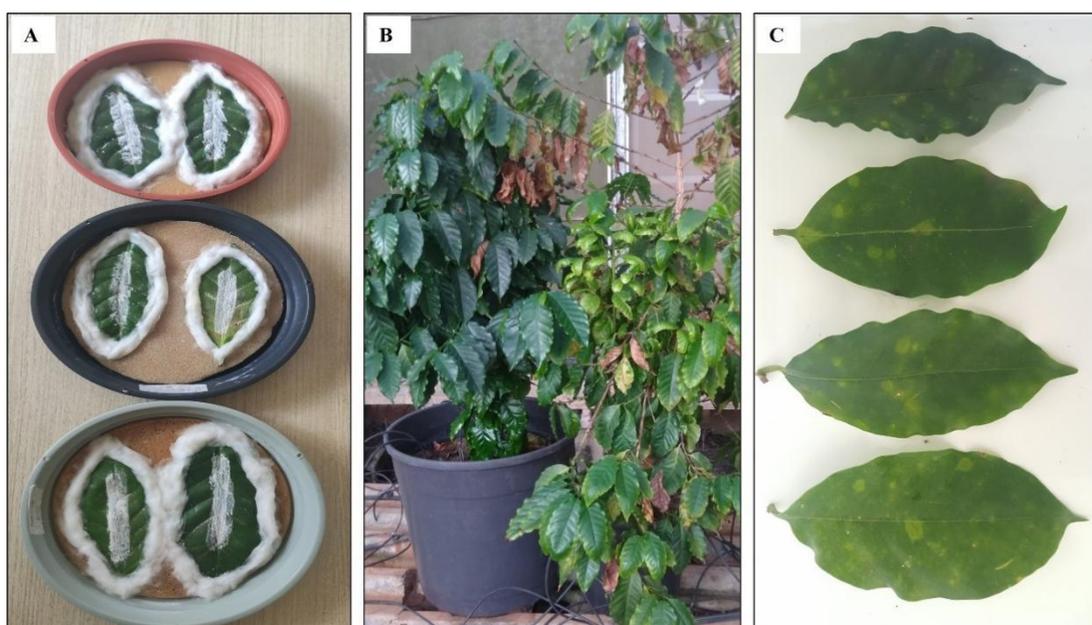
Após multiplicação das populações, foram coletadas 20 réplicas biológicas, contendo 130 ácaros em cada, tanto das populações avirulíferas quanto virulíferas, para as análises de expressão gênica de *B. yothersi* em resposta ao CiLV-C.



**Figura 9** – Frutos de laranja doce utilizados para manutenção e multiplicação de ácaros *B. yothersi*: (A) frutos sadios para multiplicação das populações avirulíferas; (B) frutos sintomáticos para multiplicação das populações virulíferas para CiLV-C (Fotos: arquivo pessoal).

#### 4.1.2 *B. yothersi* em plantas de cafeeiro sadias ou infectadas com CoRSV

A população de ácaros *B. yothersi* avirulíferos em cafeeiro (*Coffea arabica*) foi obtida a partir de ovos retirados de frutos de laranja doce e transferidos para folhas sadias destacadas de cafeeiro (Figura 10A), dispostas em bandejas sobre espuma, circundadas com algodão umedecido e armazenadas em sala climatizada, com controle de temperatura ( $25^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa (UR – 70% a 80%) e fotoperíodo de 12/12 horas. Para a obtenção da população virulífera para CoRSV, ácaros avirulíferos foram mantidos em fontes de inóculo (folhas sintomáticas) para aquisição viral e, após duas semanas, transferidos para as plantas de cafeeiro para a inoculação do vírus. Essas plantas foram mantidas em casa de vegetação para a multiplicação da população de ácaros virulíferos (Figura 10B). Após multiplicação das populações, também foram coletadas 20 réplicas biológicas, contendo 130 ácaros em cada, para as análises de expressão gênica de *B. yothersi* em resposta ao CoRSV.



**Figura 10** - Material vegetal para manutenção e multiplicação de ácaros *B. yothersi* avirulíferos e virulíferos para CoRSV: (A) folhas sadias de café destacadas, dispostas em bandejas sobre espuma umedecida; (B) cafeeiros para multiplicação da população virulífera; (C) folhas com manchas anelares causadas pela infecção viral (Fotos: arquivo pessoal).

#### 4.2 Extração de RNA total de *B. yothersi* e detecção molecular de VTB

A extração de RNA total dos ácaros foi realizada com “RNAqueous™ - Micro Kit” (Ambion, Thermo Fisher, Vilnius, Lituânia), seguindo protocolo do fabricante. Em seguida, as amostras foram tratadas com DNase (Ambion, Thermo Fisher, Vilnius, Lituânia) para remoção de possível DNA genômico. A concentração e a qualidade do RNA foram avaliadas em espectrofotômetro (NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer – Thermo Fisher Scientific,

Wilmington, DE, EUA), e armazenado em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até posterior síntese de cDNA.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando “iScript™ cDNA Synthesis Kit” (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), com o volume final da reação de 20  $\mu\text{L}$  contendo: 4  $\mu\text{L}$  de tampão 5X, 1  $\mu\text{L}$  de enzima transcriptase reversa, 500 ng de RNA total e água para completar o volume final. As condições da reação foram de  $25^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos,  $46^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos e  $95^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto. O cDNA obtido foi diluído em água estéril e livre de RNAses na proporção de 1:25 para as análises de expressão gênica via RT-qPCR.

A confirmação do status de cada população de ácaro, virulífera ou não, foi realizada via detecção molecular por RT-PCR, usando para as reações o kit “GoTaq® Colorless PCR Master Mix” (Promega, Madison, WI, EUA) e os iniciadores específicos para a detecção dos diferentes vírus (Tabela 2). Os produtos das reações foram visualizados em gel de agarose 0,8% (TAE 1X e brometo de etídeo), sob luz ultravioleta (UV) em fotodocumentador (L-PIX EX, Loccus, Brasil).

**Tabela 2** - Informações e sequências dos iniciadores usados para detecção dos VTBs via RT-PCR.

VTB*	Sequência (5' – 3')	Referência
CiLV-C	<i>p24-F</i> : CTCATGATATCCTTGATGACC	Chabi-Jesus et al., 2021
	<i>p24-R</i> : CAACCTTCTCAACCTTATTAGTC	
CoRSV	<i>RdRp-F</i> : GGACCATGAGACAGGAGGTG	Kitajima et al., 2011
	<i>RdRp-R</i> : CTCTGCCAGTCCCTCAATGTG	

\*CiLV-C: citrus leprosis virus C; CoRSV: coffee ringspot virus

### 4.3 Seleção de genes e validação dos iniciadores para RT-qPCR

A seleção dos genes de interesse foi realizada por busca na literatura de trabalhos relacionados a interação vírus-vetor e dos dados obtidos no transcriptoma de *B. yothersi* em resposta ao CiLV-C (SINICO, 2018). Para seleção dos genes relacionados à resposta imune foi feita uma busca pelos ortólogos no genoma “draft” de *B. yothersi*, depositado no banco de dados ORCAE (Online Resource for Community Annotation of Eukaryotes) (STERCK et al., 2012; NAVIA et al., 2019), usando como referência os genes de *T. urticae* (GRBIC et al., 2011). No geral, foram selecionados 51 genes (Tabela 3).

Os iniciadores foram desenhados usando o programa “Primer Quest Tool” (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, EUA), com base nas sequências codificantes (CDS) do genoma de *B. yothersi* e considerando as junções éxon-éxon. Em seguida, a especificidade destes iniciadores foi verificada via BlastX, visando pareamento somente com o gene de interesse (menor *e-value*).

Após síntese, os iniciadores foram validados via RT-PCR, utilizando como molde o cDNA de *B. yothersi* advindo do RNA previamente extraído. As condições de amplificação

foram de um ciclo de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos, com extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2% (TAE 1X e brometo de etídeo), sob luz UV em fotodocumentador.

Os produtos da RT-PCR foram purificados e sequenciados usando sistema “BigDye® Terminator Cycle Sequencing” (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, EUA), em sequenciador ABI Prism 3500xL (Applied Biosystems, CA, EUA). Cada reação consistiu em 0,5 µL do iniciador específico, 0,4 µL de “Big Dye”, 1,8 µL de tampão “Save Money” e 20 ng do amplicom purificado, completando o volume final de 10 µL com água estéril. As condições da reação foram de 95°C por um minuto, 24 ciclos de 95°C por 5 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos. Os eletroferogramas gerados foram analisados no programa BioEdit (HALL, 1999) e as sequências obtidas comparadas no banco de dados ORCAE, via função BlastX.

**Tabela 3** - Informações dos genes selecionados para análise da expressão gênica de ácaros *B. yothersi* em resposta a VTBs: função ou via associada, símbolo, nome e locus no genoma.

<b>Função/Via</b>	<b>ID<sup>1</sup></b>	<b>Nome do gene</b>	<b>Locus<sup>2</sup></b>
Detoxificação de xenobióticos	CYP4A10	Cytochrome P450 4A10	bryot41g00250
	CYP3A6	Cytochrome P450 3A6-like	bryot89g00270
	CCE	Carboxylesterase	bryot162g00010
	GST	Glutathione S-transferase Mu 1-like	bryot107g00170
	ABC	ABC transporter G family member	bryot324g00140
Hidrólise de acetilcolina	AChE	Acetylcholinesterase	bryot802g00010
Estresse oxidativo	POD	Peroxidase	bryot140g00070
	SOD	Superoxide dismutase	bryot07g00190
	CAT	Catalase	bryot45g00110
Protease digestiva	CathB	Cathepsin B	bryot06g01080
Hidrólise de quitina	Chit3	Chitinase 3	bryot149g00230
Ligação citoesqueleto	PYD	Tight junction protein ZO/polychaetoid	bryot71g00250
Reprodução	Vtg	Vitellogenin	bryot61g00340
Imunidade	Hsp70	Heat shock 70 kD	bryot150g00560
Transporte de lipídeo/Desenvolvimento embrionário	NRF6	Nose resistant to fluoxetine protein	bryot50g00160
Ligação de cálcio	CRT	Calreticulin	bryot387g00010
Resposta ao estresse do RE/UPR	IRE1 $\alpha$	Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1	bryot273g00190
	TRAF5	TNF receptor-associated factor 5-like	bryot77g00280
	XBP1	X-box-binding protein1	bryot403g00040
Via IMD	Ankyrin (Ank)	Ankyrin-3-like isoform X2	bryot07g00110
	Iap2	Baculoviral IAP repeat-containing protein 7	bryot391g00140
	Relish	Relish	bryot122g00220
	NF $\kappa$ B	Nuclear factor NF $\kappa$ B	bryot122g00190
	UBC2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like	bryot33g00080
	Uev2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	bryot465g00060
Via JNK	Sick	Protein sickie	bryot349g00080
	Hemipterous (Hep)	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 7	bryot137g00050

	Basket	Stress-activated protein kinase JNK	bryot04g00530
	Kayak	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2	bryot370g00090
	Tak1	TAK1	bryot17g00750
Via JAK/STAT	Domeless	Cytokine receptor-like	bryot42g00150
	Hopscotch (Hop)	Activated CDC42 kinase 1	bryot06g00400
	Stat	Signal transducer and activator of transcription	bryot11g00180
Via TOLL	Cactin	Cactin	bryot126g00110
	Cactus	Cactus	bryot299g00050
	Myd88	Myeloid differentiation primary response protein MyD88	bryot101g00040
	Dorsal	Embryonic polarity protein dorsal-like	bryot12g00640
	Gprk6	G protein-coupled receptor kinase 6	bryot251g00500
	Grass (SP43)	Trypsin serine protease	bryot132g00240
	Nec	Serpin B3-like	bryot242g00210
	Pelle	U-box domain-containing protein 33-like	bryot30g00080
	Pellino	E3 ubiquitin-protein ligase pellino homolog 2	bryot36g00370
	Spätzle	Protein spaetzle	bryot112g00220
	Spirit (SP27)	Serine proteinase stubble-like	byot03g00470
	TI-1	Protein Toll	bryot604g00020
TI-2	Protein Toll	bryot135g00330	
Resposta celular	Mcr	Macroglobulin complemente-related ortholog	bryot677g00010
	Draper (Drpr)	Draper ortholog	bryot19g00350
Silenciamento de RNA	DCL1	Dicer like 1	bryot176g00120
	AGO2	Argonaute 2	bryot127g00050
	RdRp	RNA-dependent RNA polymarease	bryot209g00390

<sup>1</sup>Símbolo referente aos genes selecionados

<sup>2</sup>Identificação do *locus* no genoma de *B. yothersi*, depositado no banco de dados Orcae

#### 4.4 Análise de expressão gênica diferencial

##### 4.4.1 Validação da expressão gênica por RT-qPCR

As reações foram realizadas utilizando “GoTaq® qPCR Master Mix” (Promega, Madison, WI, EUA) em equipamento QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), com volume final da reação de 12 µL contendo: 6,5 µL de GoTaq® Mix, 0,5 µL de cada iniciador (10 mM), 3 µL do cDNA diluído (1:25) e 1,5 µL de água. As condições de amplificação foram de um ciclo de 95°C por 20 segundos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos. As reações para cada par de iniciadores foram realizadas em duplicatas, incluindo os controles (reação sem cDNA molde).

A eficiência (E) de amplificação dos iniciadores e o valor de quantificação (Cq) foram calculados através do software Real-time PCR Miner (ZHAO; FERNALD, 2005). O valor Cq de cada amostra biológica foi estimado como média das duplicatas, convertido em quantidades relativas (RQ), através da função  $RQ = E^{\Delta Cq}$ , sendo  $\Delta Cq$  a diferença entre o menor valor de Cq em todas as amostras para o gene analisado e o valor Cq de uma determinada amostra. Em seguida foi calculada a quantidade relativa normalizada (NRQ) de

cada amostra, sendo a razão da RQ da amostra e a RQ do gene de referência. Ao final, foram calculados os valores de *foldchange*, obtidos pela razão entre os níveis de expressão das repetições biológicas virulíferas em relação aos níveis de expressão das repetições avirulíferas.

Uma análise entre as amostras dos tratamentos avirulíferos (ácaros mantidos em frutos de laranja doce sadios × ácaros em folhas sadias de cafeeiro) também foi realizada, visando identificar influência da hospedeira vegetal na expressão gênica.

Após obtenção dos valores de *foldchange* foi realizada uma análise de *outliers*, para encontrar valores significativamente discrepantes ( $p < 0,05$ ) dentro de cada tratamento. Em seguida, foi realizado teste *t de Student*, comparando as médias de expressão entre os tratamentos. As análises de *outliers*, estatísticas e os gráficos foram realizados em software GraphPad Prism v.9.0.2 (SWIFT, 1997).

#### 4.4.2 Seleção de normalizadores para *B. yothersi* em resposta a dichorhavirus

Genes normalizadores foram previamente identificados e validados para *B. yothersi* em resposta ao CiLV-C, em diferentes estágios de desenvolvimento e em resposta a diferentes hospedeiras vegetais (ROGERIO et al., 2019). Portanto, as análises de expressão gênica de *B. yothersi* em resposta ao cilevírus CiLV-C foram realizadas utilizando-se os genes GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e UBQ (*Ubiquitin*) como normalizadores, conforme descrito em Rogerio et al. (2019).

No entanto, por ainda não haver validação de genes normalizadores em resposta a dichorhavirus, antes das análises de RT-qPCR de *B. yothersi* em resposta ao CoRSV, foi realizada uma avaliação de diferentes genes candidatos de *B. yothersi*: GAPDH, UBQ, EF1 $\alpha$  (*Elongation factor 1 $\alpha$* ), ACT (*Actin*), RPL13 (*Ribosomal protein L13*), RPL32 (*Ribosomal protein L32*) e TUB ( *$\alpha$ -Tubulin*). Para a seleção dos normalizadores, foram coletadas cinco repetições biológicas de *B. yothersi* avirulíferos e virulíferos para CoRSV, contendo 100 ácaros em cada repetição. A extração de RNA e a síntese de cDNA destes ácaros foram realizadas conforme descrito em 4.2, e a RT-qPCR foi feita em triplicata, conforme descrito em 4.4.1.

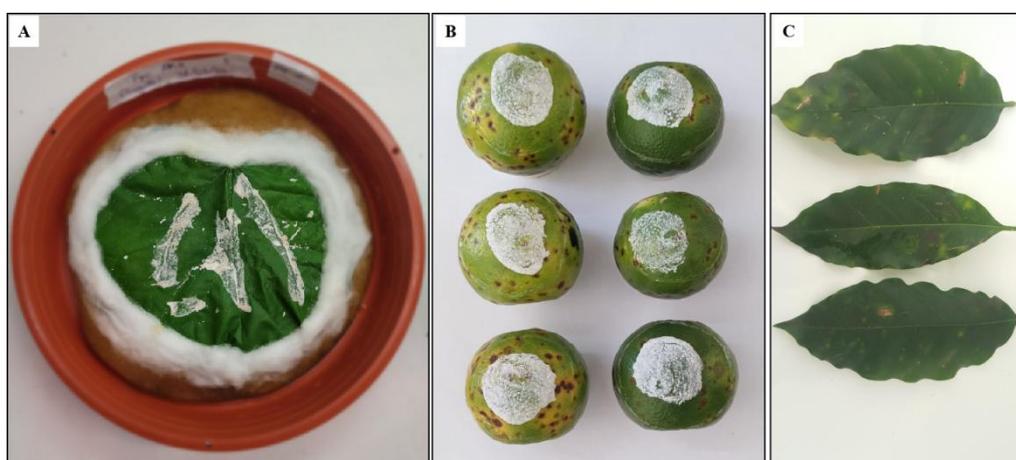
A análise dos melhores candidatos a normalizadores para *B. yothersi* na interação com dichorhavirus foi realizada utilizando-se o programa RefFinder (XIE et al., 2012), comparando e classificando os genes em função da estabilidade de expressão. O programa avaliou a estabilidade por meio dos algoritmos: geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), NormFinder (ANDERSEN et al., 2004), BestKeeper (PFAFFL et al., 2004) e pelo método  $\Delta Cq$  comparativo (SILVER et al., 2006). Por fim, o programa RefFinder atribuiu uma

classificação final com base na média geométrica (GM) dos genes candidatos para cada algoritmo.

#### 4.5 Avaliação da resposta biológica de *B. yothersi* a composto xenobiótico

##### 4.5.1 Entrega de peróxido de hidrogênio para *B. yothersi* via ingestão oral

Os ácaros *B. yothersi* avirulíferos foram mantidos para multiplicação em folhas destacadas de feijão de porco (*Canavalia ensiformes*), dispostas em bandejas com espuma, circundadas com algodão umedecido e armazenadas em sala climatizada (Figura 11A). As populações virulíferas foram mantidas em frutos de laranja doce e folhas de cafeeiros sintomáticos, respectivamente, para a leprose e a mancha anular (Figura 11B, C).

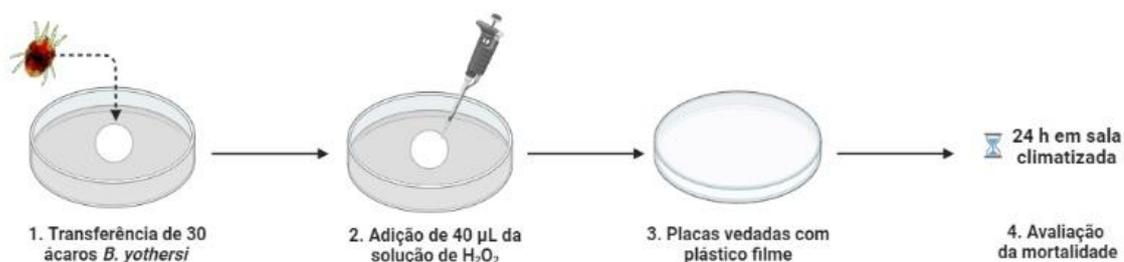


**Figura 11** - Material biológico para multiplicação das populações de ácaros: (A) ácaros *B. yothersi* avirulíferos mantidos em folhas destacadas de feijão de porco; (B) frutos de laranja doce sintomáticos para leprose usados na multiplicação de ácaros virulíferos para CiLV-C; (C) folhas de cafeeiro com sintomas causados pela infecção com CoRSV para multiplicação de ácaros virulíferos (Fotos: arquivo pessoal).

A resposta biológica e molecular de ácaros *B. yothersi* à ingestão de ROS foi observada via entrega artificial do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Merck, Darmstadt, Alemanha, #K40128210), por meio da ingestão oral em papel filtro. Foi usada solução de  $H_2O_2$  por apresentar uma meia-vida longa e não ser tão reativa (BARBOSA et al., 2014; NOCTOR et al., 2016). A entrega foi realizada em três concentrações de  $H_2O_2$  (1%, 3% e 5%) e água estéril como controle. O experimento consistiu em três repetições biológicas para cada concentração avaliada.

Foram utilizadas placas de Petri (90 × 15 cm), isoladas com algodão umedecido, contendo um disco de papel filtro (2 cm de diâmetro). Em cada disco foram transferidos 30 ácaros adultos e, em seguida, adicionados 40  $\mu$ L da solução. Após entrega da solução, as placas foram vedadas com filme plástico Parafilm® e mantidas em sala climatizada, com

controle de temperatura ( $25^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa (UR – 70% a 80%) e fotoperíodo de 12/12 horas, por 24 horas (Figura 12). Após esse período foi avaliada a taxa de mortalidade. O experimento foi realizado com ácaros avirulíferos e virulíferos para CiLV-C e CoRSV.



**Figura 12** – Ilustração da entrega de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sob as diferentes concentrações, via ingestão oral em papel filtro para *B. yothersi* avirulífero e virulífero para CiLV-C ou CoRSV: (1) ácaros *B. yothersi* foram transferidos para disco de papel filtro (2 cm), disposto em placa de Petri isolada com algodão umedecido; (2) em seguida foram adicionados 40 µL da solução de peróxido de hidrogênio; (3) as placas foram vedadas com filme plástico e (4) armazenadas em sala climatizada por 24 horas, quando foi realizada a contagem dos ácaros. Ilustração criada na plataforma BioRender.

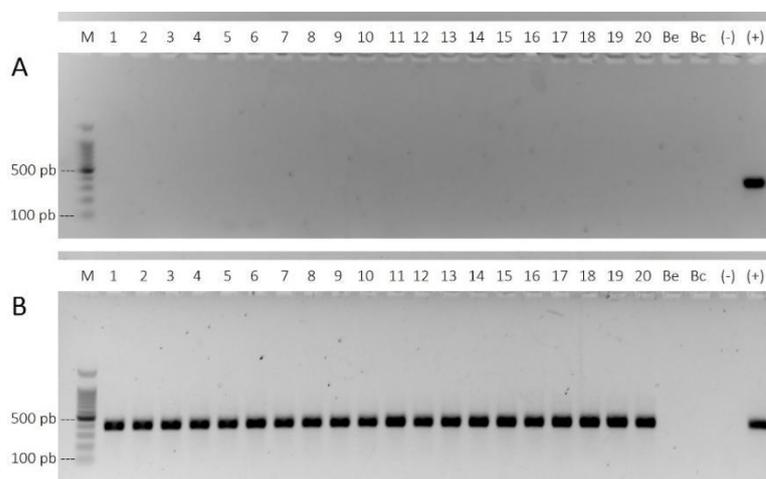
Após avaliação da mortalidade, os ácaros vivos foram coletados para extração de RNA total, utilizando protocolo otimizado para pequenas quantidades de ácaros (GIBBS; MACKENZIE, 1997; KUBO et al., 2011). As amostras foram tratadas com DNase (Ambion, Thermo Fisher, Vilnius, Lituânia) e quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer – Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). O cDNA foi sintetizado a partir de 40 ng de RNA, utilizando “iScript™ cDNA Synthesis Kit” (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), seguindo protocolo do fabricante. Em seguida, o cDNA foi diluído em água estéril e livre de RNase e submetido a RT-qPCR (conforme descrito em 4.4.1) com primers específicos para avaliar a expressão dos transcritos SOD, CAT e POD, genes envolvidos nos processos de detoxificação de ROS.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ácaros *B. yothersi* em diferentes hospedeiras de VTBs

#### 5.1.1 *B. yothersi* em frutos de laranja doce sadios ou infectados com CiLV-C

O RNA total extraído das amostras de ácaros apresentou concentração e qualidade com taxa de absorvância  $A_{260}/A_{280}$  dentro dos parâmetros ideais (1,8 – 2,2) e necessários às análises posteriores. A detecção molecular confirmou, por meio de iniciadores específicos para o gene *p24* (CHABI-JESUS et al., 2021), que apenas ácaros mantidos em frutos sintomáticos para leprose estavam virulíferos para CiLV-C linhagem SJP (Figura 13). Não foram detectadas bandas nas reações controle, indicando ausência de contaminação e ampliações inespecíficas.



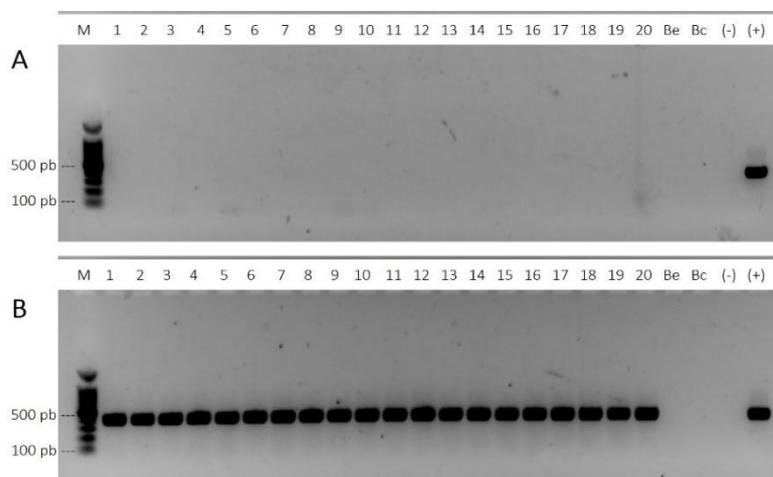
**Figura 13** - Amplificação do produto da RT-PCR de amostras de ácaros *B. yothersi* mantidos em (A) frutos de laranja doce sadios e (B) frutos sintomáticos para leprose: (1-20) amostra de RNA de ácaros; (Be) controle da extração de RNA; (Bc) controle da síntese de cDNA; (-) controle negativo da PCR; (+) controle positivo para CiLV-C; (M) marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, G2101 #304492). Amplicon CiLV-C: 393 pb. Gel de agarose 0,8%.

#### 5.1.2 *B. yothersi* em plantas de cafeeiro sadias ou infectadas com CoRSV

Apesar de *B. yothersi* apresentar menor taxa de eficiência de transmissão de CoRSV (NUNES et al., 2018), foi possível a multiplicação da população virulífera em cafeeiros, após transferência dos ácaros previamente mantidos em fonte de inóculo de CoRSV.

Contudo, não foi possível manter a população de ácaros avirulíferos em plantas de cafeeiros sadios. Posteriormente, foi verificado que os ácaros não eram encontrados nas folhas ou ramos, mas somente no caule próximo ao substrato do vaso, dificultando tanto a multiplicação da população quanto as coletas de amostras. Sendo assim, a manutenção dos ácaros em folhas sadias, destacadas de cafeeiro, ofereceu maior praticidade e eficiência para multiplicação da população avirulífera. As análises moleculares (RT-PCR), utilizando

iniciadores específicos para CoRSV, confirmaram a ausência e presença do vírus nas populações experimentais (Figura 14).

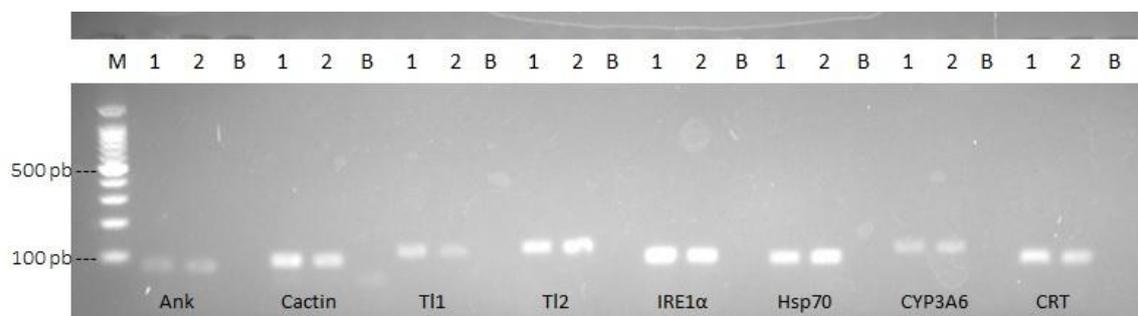


**Figura 14** - Amplificação do produto da RT-PCR de amostras de ácaros *B. yothersi* mantidos para multiplicação em (A) folhas destacadas de cafeeiro sadio e (B) folhas de cafeeiros com sintomas de mancha anular: (1-20) amostra de RNA de ácaros; (Be) controle da extração de RNA; (Bc) controle da síntese de cDNA; (-) controle negativo da PCR; (+) controle positivo para CoRSV; (M) marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, G2101 #304492). Amplicon CoRSV: 389 pb. Gel de agarose 0,8%.

## 5.2 Seleção e validação de iniciadores para RT-qPCR

Dentre os 51 iniciadores para validação, foi possível confirmar a amplificação de fragmentos únicos e de tamanho esperado para 42 dos genes selecionados (Figura 15; Tabela 4). Os produtos da RT-PCR foram sequenciados pelo método Sanger e confirmados via ferramenta BlastX, com as sequências apresentando identidade acima de 90% com as respectivas CDS do genoma de *B. yothersi*.

Os iniciadores que não apresentaram amplificação de fragmentos foram para as sequências dos genes Tak1 (via JNK/IMD), Domeless (via JAK/STAT), Dorsal, Gprk6, Grass (SP43), Nec, Pelle, Spätzle e Spirit (via TOLL).



**Figura 15** - Amplificação dos fragmentos para oito genes validados (RT-PCR): (1, 2) amplicons obtidos a partir de amostras de cDNA de ácaros *B. yothersi*; (B) controle da PCR (reações sem cDNA); (M) marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, G2101 #304492). Gel de agarose 2%. Os demais iniciadores apresentaram o mesmo perfil de amplificação, com fragmentos únicos e do tamanho esperado.

**Tabela 4** - Sequência dos iniciadores para RT-qPCR e tamanho dos amplicons (pares de bases, pb).

Gene	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')	pb
CYP4A10	GCATCCTCTCAGTCACATTCATA	GCAATGTTCTCAGGTGCAAAG	103
CYP3A6	CGCCACCTCACTTCCTATG	TTCGGCGAATTGTAACAGAATG	115
CCE	CAGATGAATGAAACGGCCAATC	CTGATGACCGGAACCAAACCT	78
GST	GCTTCTTCTGTCTGATCAAGTT	GCTTTCATCAATGGCTCATAGT	102
ABC	CCAAGCTCCTGTTGGAATAGT	ACGAGGATGCAGACATTCATAG	109
AChE	GAGCTTCCACCGAGATGTATG	CCCTGGAGTTACCACATTTAAGTA	99
POD	GATGATGATGGAATCGCTGAGA	AAACCTCCGGTTGACCATATC	103
SOD	GGCAAAGGTGGACATGAATTG	TACTTGGTCAGGCCAATAACTC	83
CAT	TGGAATCGAGCTGATGAAGATAC	TCATAATACTCTTTGCTCGCCTT	131
CathB	AGGTACTGACTATTGGCTGATTG	GAGCAGCATTGATACCCTCTT	119
Chit3	CATCCAGTCAGCCACCAAA	TCGCTCTGGGCAATCATAATC	89
PYD	CTAGAACTCGAGGCTATGGTTTC	TTACCTTCAGCTGGACCATT	124
Vtg	CAGTTGTTCCGGCTCCA	GAATGGCTTCTGTCCATGATA	104
Hsp70	GCTTCAACCTCAAGCAAACC	CCTCATCCACCTTATCCAGAAC	93
NRF6	TATGCCGAATTCCTGTGGATG	GGTGGCTCTCTTCTTGGTTT	76
CRT	TTGTGGTGGTGGATATCTCAA	CGAACATGATTAAGTATGGTGAGTC	86
Ank	GACTGAAGTGATGAGTCCAAGTA	GCTCCTCTTTCTCCTCAGATTT	80
Iap2	CGTGGTCTCTGTGCATCAA	GGGTGAAATGGCTGCTTTCT	87
Relish	CATTGTTACGGAAGCTGATG	GTACGTATACCTGAATCGGATGAT	102
NFκβ	CGAATCTTCTCCTCGACTTCAT	CATTGCTTGATTGTTCTCTCCAA	100
UBC2	CTAGGAGAATAATAAAGGAAACCCAAC	CAGCAACCTACTGAAATGAAATAC	108
Uev2	GAGGAACCTCGAACAAGGACAAA	GCCACTGTGTGAGTGTCCATATC	91
Sick	CACCTGCAAATTCTCTCAGTTTC	CGGAGGTAAAGTAGGACTAGGA	113
IRE1α	TGTCAACGCTCGATGGTAAAG	ACATGCCCAACAATAGGTGTATC	96
TRAF5	CGATCGGTTAAATGTCCCATAGA	GAGCTCGATGTATGCAATAAACTTC	115
XBP1	ATGAAGCGGAAGCGAGAAA	CGAGCAGTTTGAGCTGAGATA	95
Hep	GAATGAGAAGAGATACAAGTTGTGC	TTGTTGCCTTGTGTTCCATT	104
Basket	TTTATCCGGTGGTGGTTGG	CCACAGCAGAGCAGACTATT	105
Kayak	CGTATACAAATGGTAACAGTAGTTCCT	GTGAAGAAGGAGGAAAGGAAGAG	75
Hop	GTGGCTTGAACCATGTGAAC	CTTGCTTGTCAATTCTCGCTAAA	119
Stat	CAGCAAGTGACGATGGAGAA	AGCTCTTCGATTCCGGCTTG	107
Cactin	GAAGCGGAAAGGAGAAGAGAAG	CTGGCCCACTCATCGAAATTA	89
Cactus	GAAACTCTGCTCCATCGCAA	CAAGTGTAACAAGTTTCACCTTCATAG	84
MyD88	GACAGCCTAGGGCATCAATTA	ATTGAGTTCAACCCATTGCTTAC	79
Pellino	AAACTAGAGTCATCCAGGACAAAAG	GAGCGTCCAATCTGGAACAT	99
Tl-1	AGTGTCGCAAGTGTGAATAA	AAGATGTGGATGGAGGTGTAAG	110
Tl-2	AAGTTCAGCAGTCAGTACAC	TTGGAAACCTTGAAACATGGC	116
Mer	ATGGGAGATTTATGTGGATCCTAAG	CACCGTGCATATGGTCATGATA	110
Drpr	GGAATAATTGAGAAGAGAGAAGTG	CATCTTGGTGGCATCTTTGG	93
DCL1	TCGTTTCAGTAAGCCTGATTTCG	GACCAACTCCAACGTATGTTCT	106
AGO2	CATTCCGGCTCCAACCTATT	ATCACCGCTGTATTCCGGTAAG	148
RdRp	TTGGTGAAGCAGAGCCATTTA	CTCCACAAGTGACGAGCATATT	97

### 5.3 Análise de expressão gênica diferencial

#### 5.3.1 Seleção de normalizadores para *B. yothersi* em resposta a dichorhavirus

Com o programa RefFinder, foi possível classificar os normalizadores mais estáveis para análise de expressão gênica, através de uma combinação de diferentes algoritmos ( $\Delta Cq$  comparativo, geNorm, NormFinder e BestKeeper). De acordo com os resultados obtidos pelos algoritmos  $\Delta Cq$  comparativo, geNorm e NormFinder, a ordem de estabilidade dos genes candidatos a normalizadores foi: EF1 $\alpha$  > UBQ > TUB > RPL32 > ACT > GAPDH > RPL13, enquanto para o algoritmo BestKeeper, a ordem de estabilidade foi: EF1 $\alpha$  > UBQ > RPL32 >

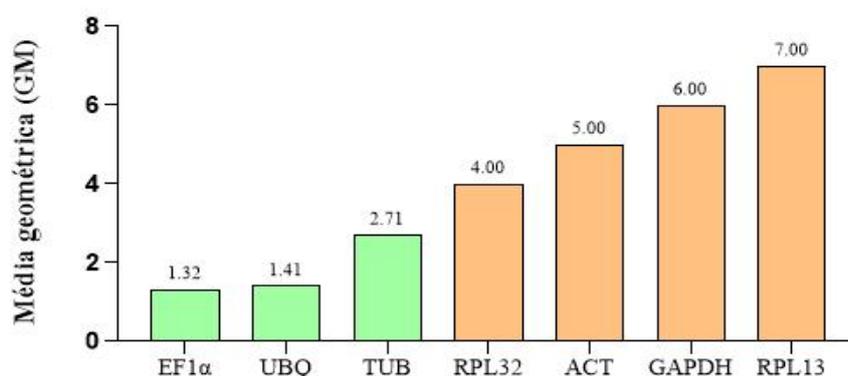
TUB > ACT > GAPDH > RPL13 (Tabela 5). O programa RefFinder identificou EF1 $\alpha$  (GM = 1,32) e UBQ (GM = 1,41) como os genes de referência mais estáveis, representados pelos valores mais baixos entre as amostras, enquanto RPL13 (GM = 7), GAPDH (GM = 6), ACT (GM = 5) e RPL32 (GM = 4) foram os genes menos estáveis (Tabela 5; Figura 16).

Portanto, considera-se EF1 $\alpha$  e UBQ como os normalizadores mais estáveis para a avaliação da interação entre *B. yothersi* e o dichorhavirus CoRSV. Os mesmos normalizadores foram utilizados em análises da interação entre *B. yothersi* e CICSV, e apresentaram valores estáveis (TASSI & ARENA, dados não publicados). É interessante notar que Rogerio et al. (2019) identificaram UBQ e GAPDH como os normalizadores mais adequados para a interação entre *B. yothersi* e o cilevírus CiLV-C, sugerindo não uniformidade destes genes quando em diferentes interações entre VTBs e ácaros.

**Tabela 5** - Ordenação dos genes candidatos a normalizadores de *B. yothersi* em resposta ao CoRSV (*Dichorhavirus*), classificados de acordo com valores de estabilidade da expressão para cada algoritmo.

	$\Delta Cq$		geNorm		NormFinder		BestKeeper		RefFinder	
	Gene	SD <sup>1</sup>	Gene	M <sup>2</sup>	Gene	SV <sup>3</sup>	Gene	r <sup>4</sup>	Gene	GM <sup>5</sup>
1	EF1 $\alpha$	0,47	EF1 $\alpha$	0,197	EF1 $\alpha$	0,099	EF1 $\alpha$	0,978	EF1 $\alpha$	1,32
2	UBQ	0,5	UBQ	0,197	UBQ	0,16	UBQ	0,926	UBQ	1,41
3	TUB	0,59	TUB	0,299	TUB	0,355	RPL32	0,906	TUB	2,71
4	RPL32	0,63	RPL32	0,402	RPL32	0,446	TUB	0,826	RPL32	4
5	ACT	0,63	ACT	0,446	ACT	0,472	ACT	0,815	ACT	5
6	GAPDH	0,7	GAPDH	0,511	GAPDH	0,541	GAPDH	0,802	GAPDH	6
7	RPL13	0,97	RPL13	0,644	RPL13	0,907	RPL13	0,521	RPL13	7

SD<sup>1</sup>: desvio padrão de  $\Delta Cq$  comparativo; M<sup>2</sup>: média do valor de estabilidade da expressão; SV<sup>3</sup>: valor de estabilidade; r<sup>4</sup>: correlação de Pearson; GM<sup>5</sup>: média geométrica.



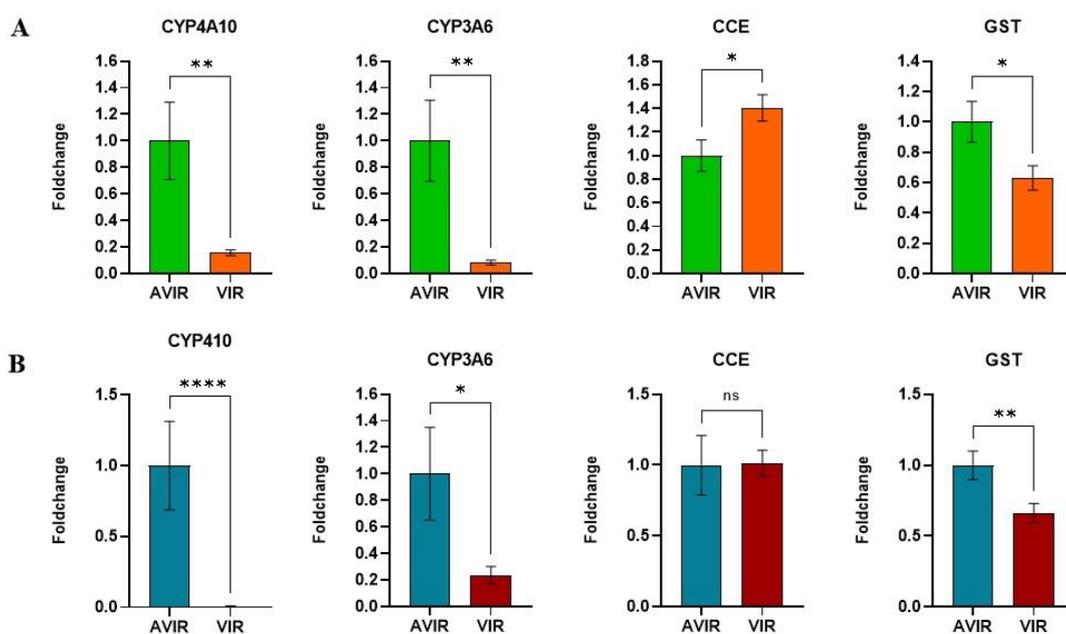
**Figura 16** - Classificação final dos candidatos a normalizadores de acordo com programa RefFinder, comparando os valores da média geométrica (GM) atribuída para cada gene com base nos dados de estabilidade calculada pelos algoritmos. As barras verdes indicam os genes mais estáveis (menor valor GM). As barras laranjas indicam os genes menos estáveis.

### 5.3.2 Expressão gênica de *B. yothersi* em resposta aos VTBs

#### 5.3.2.1 Genes associados a detoxificação de xenobióticos

Dentre os nove genes relacionados à detoxificação, foi possível avaliar a expressão de sete genes via RT-qPCR. Os genes *AChE* e *ABC* não apresentaram valores de quantificação em nenhuma das condições (ácaros avirulíferos × virulíferos) para os VTBs avaliados (CiLV-C e CoRSV). Através das análises de expressão gênica, podemos observar que a maioria dos genes foi reprimida em ácaros virulíferos em relação ao controle (ácaros avirulíferos).

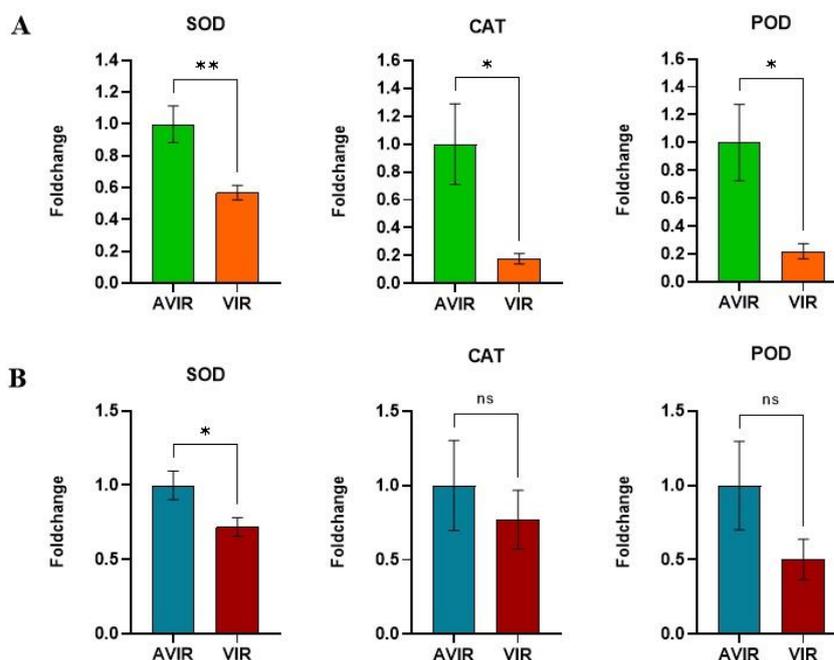
Os genes *CYP4A10*, *CYP3A6* e *GST* foram significativamente reprimidos em ácaros virulíferos, para ambos os vírus (Figura 17). A exceção foi para o gene *CCE*, que foi induzido nos ácaros virulíferos para CiLV-C, mas não apresentou diferença na expressão entre os ácaros avirulíferos ou virulíferos para CoRSV.



**Figura 17** - Perfil de expressão dos genes associados a detoxificação de xenobióticos em ácaros *B. yothersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros avirulíferos (AVIR), mantidos em frutos sadios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros virulíferos (VIR), mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas sadias de cafeeiro. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns).

Os genes *SOD*, *CAT* e *POD*, que estão associados a detoxificação de ROS, foram significativamente reprimidos em ácaros virulíferos para CiLV-C (Figura 18A). Em resposta ao CoRSV, a expressão do gene *SOD* foi significativamente reprimida em ácaros virulíferos e, embora não significativa, também para os genes *CAT* e *POD* observou-se tendência de

repressão (Figura 18B).



**Figura 18** - Perfil de expressão dos genes associados à detoxificação de moléculas de ROS em ácaros *B. yothersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos sadios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas sadias de cafeeiro. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns).

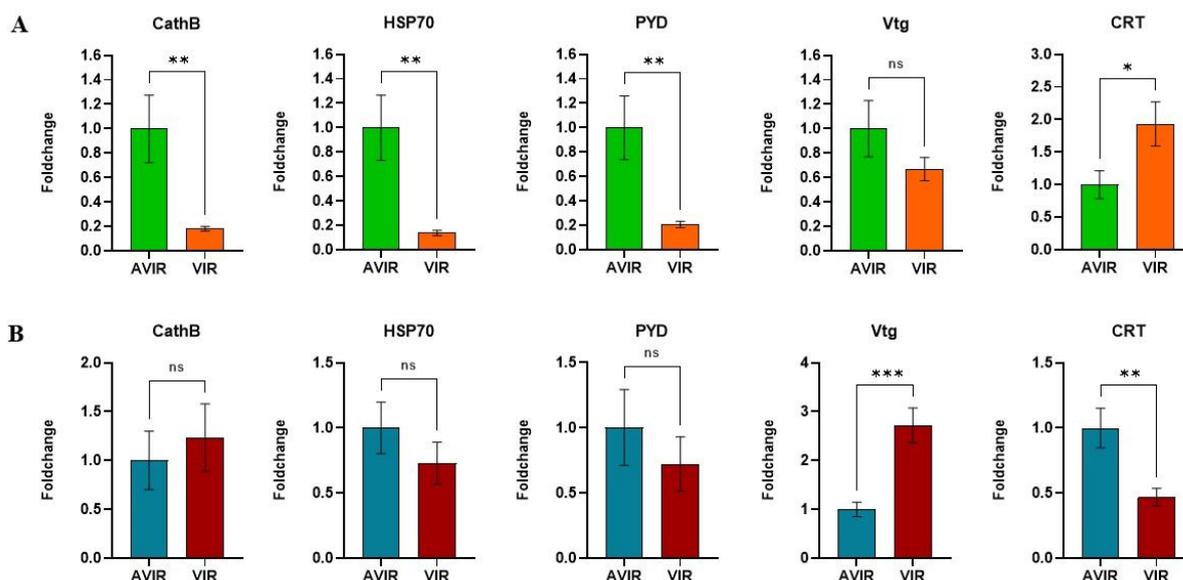
### 5.3.2.2 Genes com potencial envolvimento na interação vírus-vetor

Dos sete genes com possível associação na interação vírus-vetor, o gene *NRF6*, atribuído à síntese de proteínas envolvidas no transporte de lipídeos e desenvolvimento embrionário (CHOY et al., 2006; WATTS; BROWSE, 2006), não apresentou valores de quantificação em nenhuma das condições (ácaros avirulíferos  $\times$  virulíferos) para os VTBs avaliados.

Os genes *CathB*, *Hsp70*, *PYD* (*polychaetoid*), *Vtg* e *CRT* resultaram em diferentes perfis de expressão. Em resposta ao cilevírus CiLV-C, os genes *CathB*, *Hsp70* e *PYD* foram significativamente reprimidos em *B. yothersi* virulíferos. O gene *Vtg* apresentou uma tendência de repressão, enquanto o gene *CRT* foi significativamente induzido em ácaros virulíferos para CiLV-C (Figura 19A).

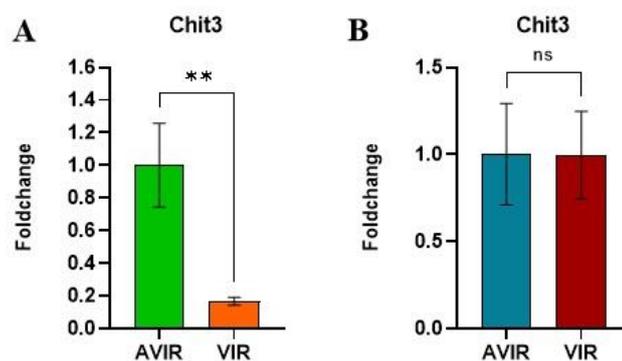
O perfil de expressão gênica de ácaros virulíferos para o dichorhavirus CoRSV parece o oposto do observado em resposta ao cilevírus CiLV-C, ainda que nem sempre os dados

tenham suporte estatístico. Ainda assim, pode-se sugerir uma tendência de indução do gene *CathB* nos ácaros virulíferos; em contrapartida, uma tendência de repressão foi observada para os genes *Hsp70* e *PYD*. Ao contrário do observado para CiLV-C, *Vtg* foi significativamente induzido em ácaros virulíferos para CoRSV, e *CRT* apresentou uma repressão significativa (Figura 19B).



**Figura 19** – Perfil de expressão dos genes associados a interação vírus-vetor em ácaros *B. yothersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos saudios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas saudias de cafeeiro. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns).

O gene *Chit3*, associado a hidrólise de quitina em ácaros, foi reprimido em *B. yothersi* em resposta ao CiLV-C (Figura 20A). Porém, não foi observada diferença entre os ácaros mantidos em cafeeiro (AVIR e VIR para CoRSV) (Figura 20B).



**Figura 20** - Perfil de expressão gênica da chitinase 3, associado a hidrólise de quitina em ácaros *B. yothersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos saudáveis de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas saudáveis de café. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafés com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns).

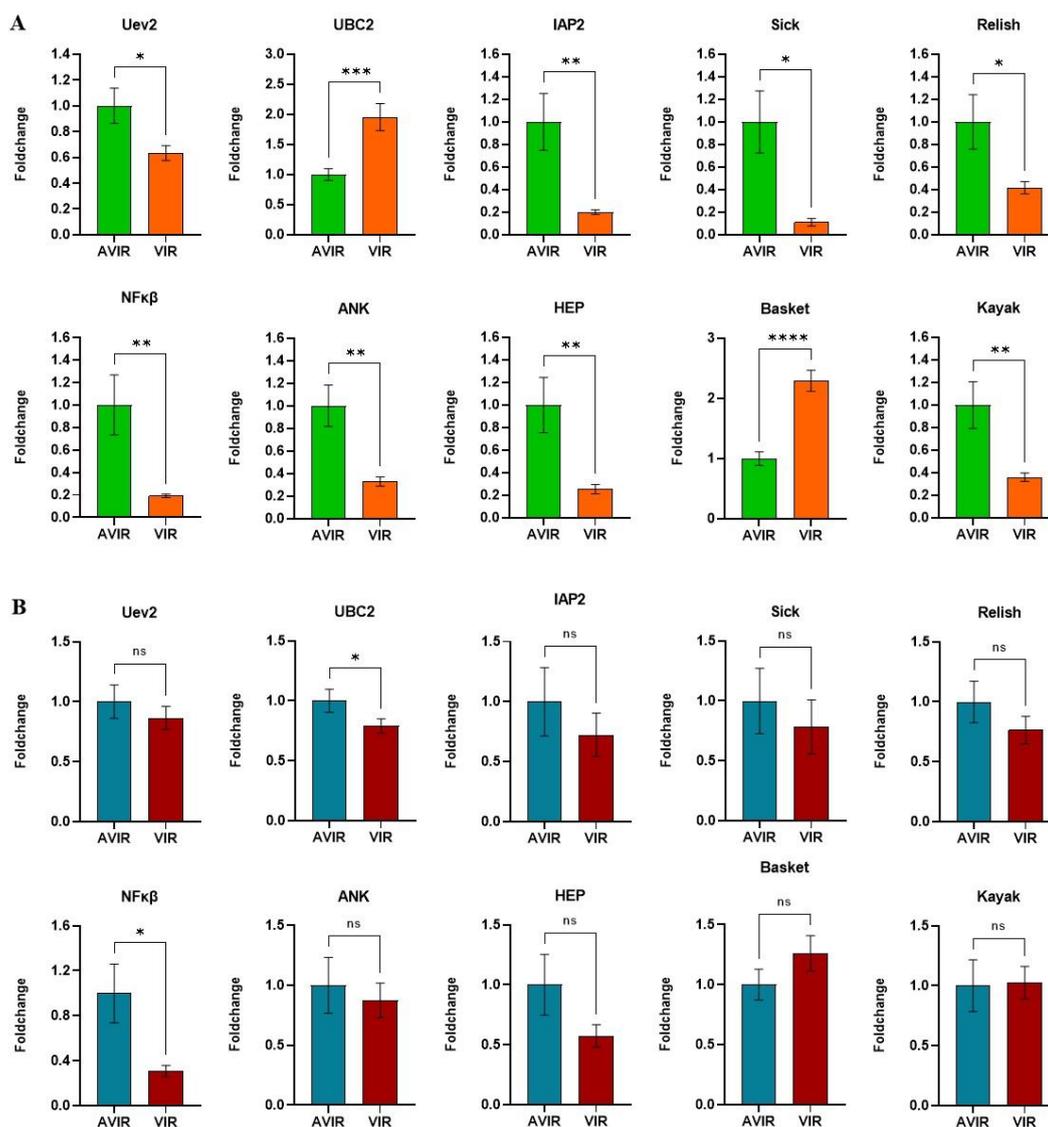
### 5.3.2.3 Genes associados ao sistema imune inato

Os genes relacionados ao sistema imune foram selecionados com base nos dados obtidos no genoma de *T. urticae* (GRBIC et al., 2011). Dentre os 29 genes conservados relatados em *T. urticae*, somente os genes de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRPs) e TEP (associado a resposta celular), não foram encontrados no genoma “draft” de *B. yothersi* (Tabela 3).

Os genes associados a via IMD encontrados no genoma de *B. yothersi* e avaliados quanto ao perfil de expressão foram: *Uev2*, *UBC2*, *IAP2*, *Sick*, *ANK*, *NFκβ* e *Relish*. Essa via está em associação com a via JNK, sendo ativada pela molécula sinalizadora *Tak1* (pertencente a via IMD) (BECHSGAARD et al., 2016). Todavia, o iniciador para sequência *Tak1* não foi validado, impossibilitando inferências e, desta forma, avaliados outros genes da via JNK, como *HEP*, *Basket* e *Kayak*.

Todos os genes relacionados à via IMD/JNK foram diferencialmente expressos em resposta ao CiLV-C (Figura 21A). Oito deles foram reprimidos, e apenas os genes *UBC2* e *Basket*, moléculas sinalizadoras, foram significativamente induzidas nos ácaros virulíferos.

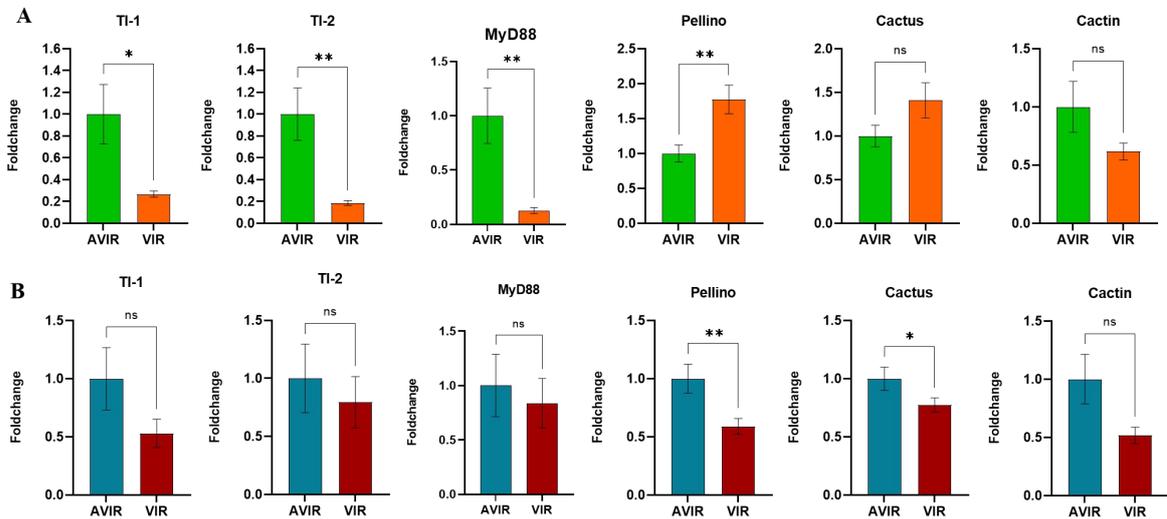
Já em resposta ao CoRSV, apenas dois genes foram significativamente reprimidos no ácaro vetor. No entanto, outros seis genes apresentaram tendência de repressão, um gene manteve-se estável e um apresentou tendência de indução. É interessante notar que um dos genes, o UBC, cuja expressão foi estatisticamente reprimida, apresentou perfil oposto ao observado no ácaro em resposta ao CiLV-C (Figura 21B).



**Figura 21** – Perfil de expressão dos genes associados ao sistema imune inato - a via IMD/JNK em ácaros *B. yothersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos sadios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas sadias de cafeeiro. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns).

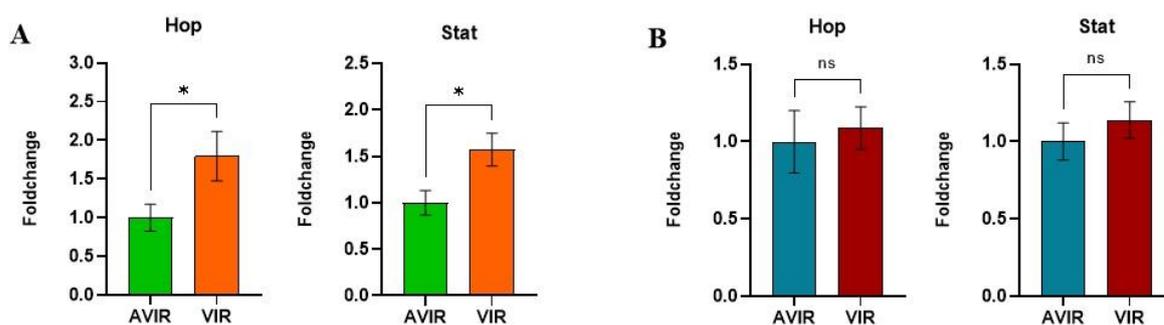
Dos 13 genes associados a via Toll, seis pares de iniciadores foram validados para os genes que codificam: duas proteínas Toll (*Tl-1* e *Tl-2*), *MyD88*, *pellino*, *cactus* e *cactin*, todos presentes no final da via de sinalização. Destes, *Tl-1*, *Tl-2* e *MyD88* foram significativamente reprimidos em resposta ao CiLV-C, enquanto *pellino* apresentou uma indução significativa em ácaros virulíferos; *cactus* e *cactin* apresentaram tendências opostas na expressão, o primeiro sendo induzido e o segundo reprimido em resposta ao CiLV-C; porém, os valores não foram significativos (Figura 22A).

Em resposta ao CoRSV, somente os genes *pellino* e *cactus* foram significativamente reprimidos nos ácaros virulíferos, os demais genes apresentaram uma tendência de repressão em resposta ao dichorhavirus (Figura 22B).



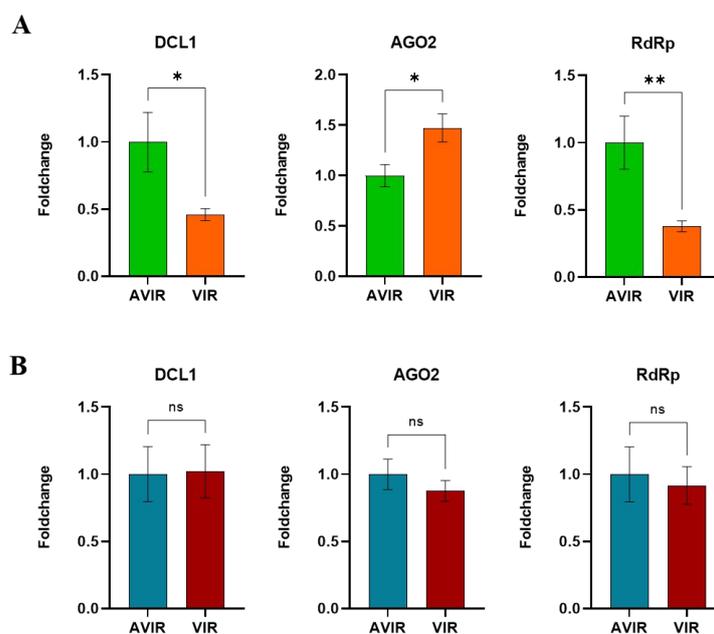
**Figura 22** - Perfil de expressão dos genes associados a via Toll em ácaros *B. yothersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos sadios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas sadias de cafeeiro. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns).

A via JAK/STAT é desencadeada pelo reconhecimento de vírus e, dos três genes selecionados, somente *Hop* (molécula de sinalização) e *Stat* (fator de transcrição) tiveram a expressão avaliada. Como observado, a via foi induzida em resposta aos VTBs, porém, a indução foi significativa em ácaros virulíferos para CiLV-C (Figura 23A). Em resposta ao CoRSV, apesar de seguir um padrão de aparente tendência à indução nos ácaros virulíferos, a expressão não diferiu do observado na população controle (AVIR) (Figura 23B).



**Figura 23** - Perfil de expressão dos genes associados a via JAK/STAT em ácaros *B. yotheresi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos saudáveis de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas saudáveis de café. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafés com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns).

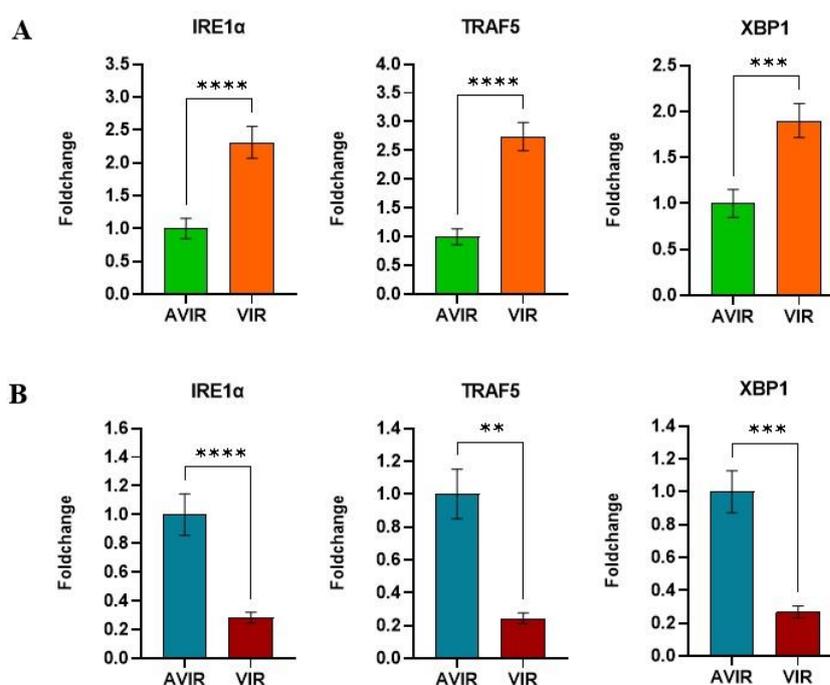
Os genes associados ao mecanismo de silenciamento de RNA também foram avaliados. Em resposta ao cilevírus CiLV-C, observamos uma repressão significativa dos genes *DCL1* e *RdRp*, enquanto *AGO2* é significativamente induzido em resposta ao VTB (Figura 24A). Em relação ao dichorhavirus, não foram observadas diferenças entre os tratamentos (Figura 24B).



**Figura 24** - Perfil de expressão dos genes envolvidos no silenciamento de RNA em *B. yotheresi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos saudáveis de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas saudáveis de café. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafés com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns).

significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns).

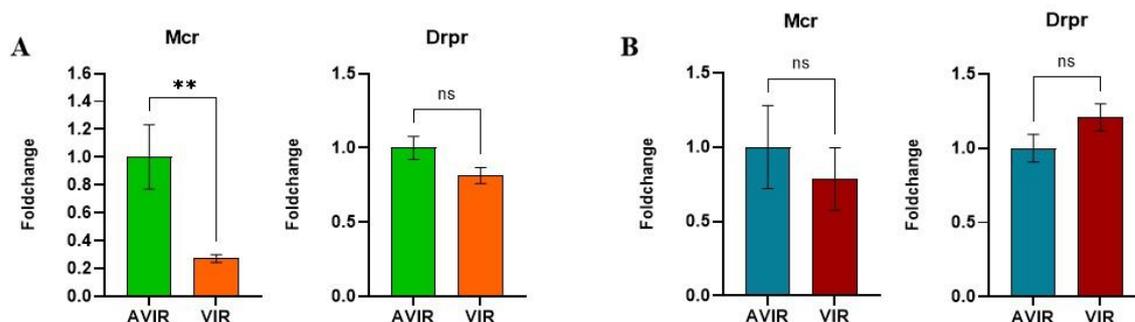
Os genes associados ao estresse do retículo endoplasmático (RE) e proteínas mal enoveladas (UPR), sugeridos como via alternativa para ativação de IMD em carrapatos (SIDAK-LOFTIS et al., 2022), também foram identificados no genoma de *B. yothersi*, permitindo a síntese de iniciadores. Para ambos os VTBs avaliados, os genes *IRE1α*, *TRAF5* e *Xbp1* apresentaram valores expressivos e com diferenças significativas em relação aos ácaros controle (AVIR), no entanto, os resultados foram contrapostos. Em resposta ao CiLV-C, os três genes foram significativamente induzidos nos ácaros virulíferos (Figura 25A), mas foram estatisticamente reprimidos em resposta ao CoRSV (Figura 25B).



**Figura 25** - Perfil de expressão dos genes associados ao estresse do retículo endoplasmático (RE) e proteínas mal enoveladas (UPR) em ácaros *B. yothersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos saudáveis de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas saudáveis de café. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafés com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns).

Alguns genes relacionados a resposta celular em *T. urticae* também tiveram seus ortólogos encontrados no genoma de *B. yothersi*, como macroglobulin (Mcr) e draper (Drpr), ambos participam da defesa celular contra patógenos em vertebrados e invertebrados. Em resposta ao CiLV-C, a expressão de ambos os genes apresentou tendência de repressão em

ácaros, contudo, somente Mcr apresentou um valor de repressão estatisticamente significativo (Figura 26A). Em resposta ao CoRSV, Mcr apresentou uma tendência de repressão, enquanto Drpr uma tendência de indução, mas as variações nas expressões não foram estatisticamente significativas (Figura 26B).

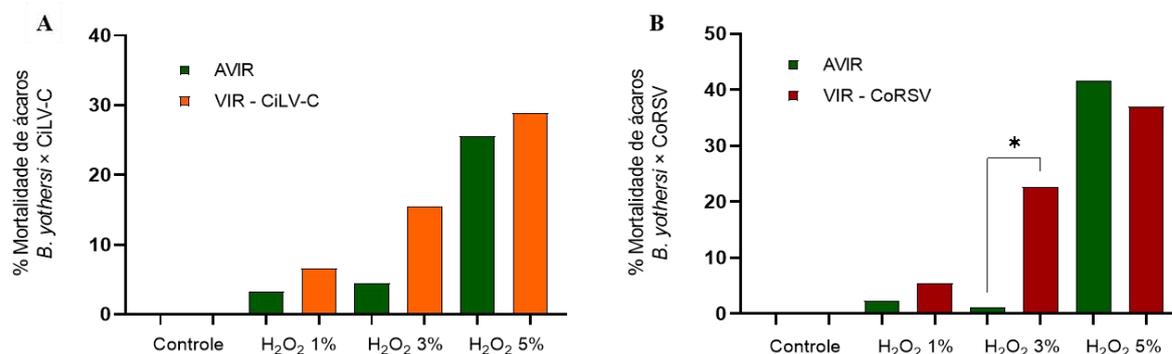


**Figura 26** - Perfil de expressão dos genes associados a resposta celular em ácaros *B. yothersi* em resposta a (A) CiLV-C e (B) CoRSV. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em frutos sadios de laranja doce. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras azuis correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas sadias de café. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafés com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das 20 réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns).

## 5.4 Avaliação da resposta biológica de *B. yothersi* a composto xenobiótico

### 5.4.1 Entrega de peróxido de hidrogênio para *B. yothersi* via ingestão oral

Ensaio piloto com concentrações de  $H_2O_2$  menores a 3% não apresentaram toxicidade aos ácaros (dados não mostrados). Assim, foram considerados resultados dos experimentos com três concentrações do produto (1%, 3% e 5%) e água estéril como controle. Os tratamentos consistiram de ácaros avirulíferos  $\times$  virulíferos para CiLV-C, e avirulíferos  $\times$  virulíferos para CoRSV, e as taxas de mortalidade avaliadas 24 horas após a entrega das soluções. Observou-se mortalidade de 3%, 4,4% e 25,6% dos ácaros avirulíferos e 6,7%, 15,6% e 28,9% nas populações virulíferas para CiLV-C, nas concentrações 1%, 3% e 5% de  $H_2O_2$ , respectivamente (Figura 27A). Seguindo a mesma ordem de concentração de  $H_2O_2$ , a taxa de mortalidade dos ácaros avirulíferos foi de 2,2%, 1,1% e 41,3%, e dos ácaros virulíferos para CoRSV de 5,6%, 22,6% e 37,1%, respectivamente, (Figura 27B). Consistentemente, os resultados mostraram maior mortalidade das populações de ácaros virulíferos do que avirulíferos, quando expostos a  $H_2O_2$ , independentemente do VTB estudado (Tabela 6).



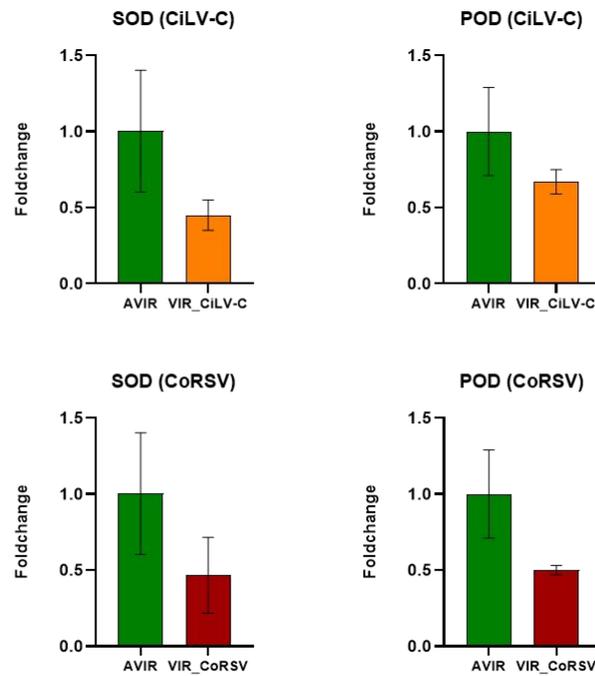
**Figura 27** – Mortalidade de ácaros *B. yothersi* avirulíferos e virulíferos para (A) CiLV-C e (B) CoRSV, após 24 horas de ingestão de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 1%, 3%, 5% e água como controle. Barras verdes: ácaros AVIR mantidos em folhas de feijão de porco. Barras laranjas: ácaros VIR para CiLV-C. Barras vermelhas: ácaros VIR para CoRSV. Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos: p < 0,05 (\*).

**Tabela 6** - Análise de mortalidade de ácaros *B. yothersi* avirulíferos (AVIR) e virulíferos (VIR) para os VTBs (CiLV-C e CoRSV).

Concentração H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>B. yothersi</i> × CiLV-C		<i>B. yothersi</i> × CoRSV	
	AVIR	VIR	AVIR	VIR
	M/T	M/T	M/T	M/T
Água (controle)	0/90 (0%)	0/90 (0%)	0/90 (0%)	0/90 (0%)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1%	3/90 (3,3%)	6/90 (6,7%)	2/90 (2,2%)	5/90 (5,6%)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	4/90 (4,4%)	14/90 (15,6%)	1/90 (1,1%)	20/90 (22,6%)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5%	23/90 (25,6%)	26/90 (28,9%)	36/90 (41,3%)	33/90 (37,1%)

M: número de ácaros *B. yothersi* mortos, após 24 horas de exposição à solução; T: total de ácaros avaliados; %: taxa média de mortalidade por tratamento, usando-se três réplicas biológicas.

Os ácaros sobreviventes coletados para extração de RNA foram analisados quanto a expressão dos genes SOD e POD, envolvidos na detoxificação de moléculas de ROS. Entretanto, devido à baixa quantidade de ácaros virulíferos sobreviventes dos tratamentos com solução H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as extrações de RNA apresentaram valores de concentração muito baixos para realização das análises quantitativas (RT-qPCR). No entanto, as coletas de ácaros do controle do experimento (ácaros mantidos em discos de papel filtro com água estéril) tiveram uma boa concentração de RNA extraído. Esses tiveram a expressão gênica de SOD e POD avaliada, evidenciando a tendência de repressão desses genes nas populações virulíferas (Figura 28) e corroborando, através de experimentos independentes, os resultados obtidos no item 5.3.2.1.



**Figura 28** – Perfil de expressão dos genes SOD e POD em *B. yothersi*. Barras verdes correspondem aos ácaros AVIR, mantidos em folhas de feijoeiro. Barras laranjas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em frutos de laranja doce com CiLV-C. Barras vermelhas correspondem aos ácaros VIR, mantidos em cafeeiros com CoRSV. Os valores de *foldchange* representam a média das três réplicas biológicas para cada tratamento. Barras de erro representam o erro padrão.

## 6 DISCUSSÃO

Pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos na interação entre *B. yothersi* e VTBs e, com avanços nos estudos do genoma e transcriptoma desse importante ácaro vetor, podemos progredir no entendimento da sua interação com fitovírus (SINICO, 2018; NAVIA et al., 2019). Sabe-se que o sucesso na transmissão viral depende da dinâmica entre vírus e vetor, sendo que modulações transcricionais causadas pelo vírus podem alterar o comportamento e adaptação (“fitness”) do seu vetor (CATTO et al., 2022). Contudo, a maioria dos trabalhos de interação discorrem sobre insetos vetores.

A análise do transcriptoma de *B. yothersi* em resposta ao CiLV-C trouxe informações relevantes sobre genes com potencial envolvimento na interação vírus-vetor, sugerindo haver impacto da presença viral no ácaro (SINICO, 2018). Esses resultados corroboram ensaios sobre os efeitos de CiLV-C na biologia de *B. yothersi*, os quais indicam que o vírus favorece a oviposição (ARENA et al., 2016; TASSI et al., dados não publicados). Por outro lado, Salinas-Vargas et al. (2019) não observaram alteração na duração do ciclo de vida, na longevidade e na fecundidade de populações de ácaros avirulíferas quando comparadas com virulíferas para CiLV-C.

O presente trabalho evidenciou, de maneira inequívoca, clara resposta de *B. yothersi* aos VTBs estudados. Isso foi possível graças ao grande número de amostras avaliadas (130 ácaros/20 réplicas biológicas por tratamento) e a ensaios pilotos que possibilitaram otimizar os testes biológicos e moleculares. Para os ensaios de RT-qPCR, foi possível estabelecer genes normalizadores mais estáveis para *B. yothersi* em resposta a dichorhavirus. Os genes GAPDH e UBQ, previamente padronizados para estudos de interação de *B. yothersi* em resposta ao cilevírus CiLV-C (ROGERIO et al., 2019), foram testados nos ácaros mantidos em cafeeiros; porém, os resultados foram inconsistentes, evidenciando a necessidade de normalizadores específicos para a resposta ao CoRSV.

Os normalizadores foram avaliados no programa RefFinder (XIE et al., 2012), através da combinação de diferentes algoritmos. O método  $\Delta Cq$  comparativo classificou os genes mais estáveis de acordo com os valores dos desvios padrão (SD) (SILVER et al., 2006). O algoritmo geNorm permitiu uma análise da média de variação aos pares de um gene em comparação com todos os outros candidatos, indicando o fator de estabilidade do normalizador (M). Assim, a maior estabilidade foi definida pelo menor valor de M (VANDESOMPELE et al., 2002). Através do NormFinder foi possível obter o valor de estabilidade (SV), seguindo variações intra e intergrupo de cada gene candidato, sendo mais estável o de menor SV (ANDERSEN et al., 2004). O algoritmo BestKeeper calculou a

estabilidade da expressão de cada gene e a relação intergene, em análises de correlação em pares. Os genes candidatos considerados mais estáveis foram os que apresentaram os maiores valores do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) (PFAFFL et al., 2004). Ao final destas análises, os normalizadores EF1 $\alpha$  e UBQ foram considerados os mais estáveis para avaliar a interação entre *B. yothersi* e o CoRSV. Os mesmos normalizadores também mostraram resultados satisfatórios para o dichorhavirus CICSV (TASSI & ARENA, dados não publicados), sugerindo estabilidade nas avaliações quantitativas (qPCR) entre o ácaro vetor e diferentes dichorhavirus.

Os genes associados a detoxificação possuem papel crucial no mecanismo de resistência em artrópodes, como insetos, ácaros e carrapatos (LI et al., 2007; VAN LEEUWEN; DERMAUW, 2016; GALL et al., 2018; ZHANG et al., 2020). Os CYP450s e esterases são importantes na primeira fase do processo de detoxificação, sendo responsáveis pela metabolização de compostos xenobióticos (como produtos químicos e metabólitos secundários das plantas), tornando-os mais reativos e solúveis, para serem secretados para fora das células (BAJDA et al., 2015; LEEUWEN; DERMAUW, 2016). Análise do transcriptoma de *T. urticae* em resposta a alimentação em diferentes hospedeiras vegetais evidenciou que genes associados a detoxificação, principalmente *CYP450* e *CCE*, foram induzidos quando os ácaros foram transferidos de sua hospedeira preferencial (*Phaseolus vulgaris*) para hospedeira que não estavam adaptados (*Solanum lycopersicum*) (GRBIC et al., 2011). Isso poderia explicar parte da habilidade que tetraniquídeos têm em se adaptarem a uma diversidade de plantas hospedeiras, detoxificarem metabólitos de plantas e desenvolverem resistência a pesticidas (GRBIC et al., 2011; ZHUROV et al., 2014; LEEUWEN; DERMAUW, 2016).

No presente trabalho, os genes relacionados a detoxificação de xenobióticos foram reprimidos em *B. yothersi* em resposta ao cilevírus CiLV-C e ao dichorhavirus CoRSV, principalmente os genes CYPs. Os genes envolvidos nos processos de oxidação-redução e responsáveis por converter peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (BITTNER et al., 2017; LU et al., 2017) também foram reprimidos em resposta aos VTBs. O gene *CCE*, ao contrário dos demais genes associados ao processo de detoxificação, foi induzido em resposta ao cilevírus CiLV-C, mas não diferiu entre as populações mantidas em cafeeiros (avirulíferos e virulíferos para CoRSV). As esterases têm importante papel na fase I da via de detoxificação. São responsáveis por incorporar um grupo hidroxil ou carboxil no composto tóxico, tornando-o mais reativo e solúvel em água, além de outras funções fisiológicas, como degradação de neurotransmissores e metabolismo de hormônios (BAJDA et al., 2015; DE

ROUCK et al., 2023). Seu papel no mecanismo de resistência a uma diversidade de acaricidas tem sido muito estudado (DE ROUCK et al., 2023). No ácaro predador *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae), a indução de CCE foi relacionada aos mecanismos de resistência a pesticidas e metabolismo de aleloquímicos (LI et al., 2007; WU; HOY, 2016). Em *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae), o processo de detoxificação é mediado pelas enzimas ABC transportadoras e CCEs, e o aumento de suas atividades foi correlacionado com a resistência a ivermectina (GALL et al., 2018).

Nossos resultados não diferiram daqueles observados por Gupta et al. (2019), onde os genes relacionados à detoxificação e ao estresse oxidativo também foram reprimidos em *A. tosicHELLa* em resposta ao WSMV. Assim, podemos inferir que a repressão desses genes tornaria *B. yothersi* mais vulnerável a compostos xenobióticos. Contudo, de alguma forma, genes como CCE poderiam tentar suprir a falta de genes detoxificantes e atuar na defesa contra esses compostos. Entretanto, para comprovação, por serem genes pertencentes a grandes famílias gênicas, futuramente, novos genes deverão ser avaliados.

Genes com potencial envolvimento na interação vírus-vetor foram reprimidos em *B. yothersi* em resposta ao CiLV-C e ao CoRSV. No entanto, em ácaros provenientes de cafeeiros e virulíferos para CoRSV, observamos uma tendência de indução dos transcritos para CathB, contrário à repressão para CiLV-C. Supostamente, essa tendência pode estar relacionada a uma resposta de adaptação às diferentes hospedeiras vegetais, o que poderia favorecer o estabelecimento de população de ácaros virulíferos. Além disso, CathB apresentou uma tendência de repressão na população de ácaros avirulíferos mantidos em cafeeiro, em relação aos ácaros avirulíferos mantidos em frutos, sugerindo que a tendência de indução observada em ácaros virulíferos foi uma resposta direto ao CoRSV (ANEXO A).

Embora genes relacionados à detoxificação sejam responsáveis pelo metabolismo de compostos secundários das plantas, contribuindo com a adaptação de artrópodes a diferentes hospedeiras, as proteases digestivas, como as cathepsinas, também estão envolvidas nesse processo de adaptação (GRBIC et al., 2011; SANTAMARIA et al., 2015). Estudos com *B. tabaci* relataram que as cathepsinas B representam genes associados ao metabolismo e transdução de sinal e foram reprimidos após aquisição dos begomovirus TYLCV e tomato yellow leaf curl China virus (TYLCCNV) e do crinivírus tomato chlorosis virus (ToCV) (*Crinivirus*, *Closteroviridae*) (LUAN et al., 2011; CATTO et al., 2022), supostamente como forma de favorecer a persistência desses vírus pelo interior do inseto vetor (LI et al., 2020).

As heat shock proteins (HSP) são proteínas induzidas em resposta a estresses abióticos e bióticos, podendo atuar na proteção celular (ZHAO; JONES, 2012). Na associação entre *B.*

*tabaci* e TYLCV, as Hsp70 são requisitadas durante a transmissão viral, participando da translocação viral (GOROVITS; CZOSNEK, 2017; CATTO et al., 2022). Entretanto, podemos observar que Hsp70 teve sua expressão reprimida em *B. yothersi* em resposta aos VTBs estudados. Já o gene PYD está associado à superfície do citoesqueleto e é responsável por proteínas que mantêm as adesões célula-célula estáveis (LINFELD et al., 2021). Na interação *B. yothersi*/CiLV-C, foi sugerido que PYD teria um potencial envolvimento no movimento paracelular de cilevírus, podendo controlar as junções septadas presentes no epitélio do ácaro (TASSI et al., 2022). Contudo, observamos uma repressão gênica nas populações virulíferas para CiLV-C. Se o cilevírus realmente apresenta movimento paracelular no vetor e se algum outro gene atuaria na regulação das junções septadas para viabilizar esse movimento são questões que precisam ser elucidadas. Em resposta ao CoRSV foi observada uma tendência de repressão do gene, o que seria um resultado esperado, uma vez que dichorhavirus são vírus transmitidos de maneira persistente propagativa, apresentando clara replicação dentro do vetor, e suas partículas não são observadas entre as células adjacentes do ácaro.

O gene Vtg, além de atuar no desenvolvimento embrionário, possui atribuições em funções não nutricionais, com envolvimento na detoxificação de radicais livres e proteção contra microrganismos (LI; ZHANG, 2017; HE et al., 2021). Estudos demonstraram que a proteína do capsídeo (CP) de TYLCV interage com Vtg, presente tanto no intestino quanto na hemolinfa de moscas-brancas e, em seguida, as partículas virais são internalizadas nas células epiteliais e/ou ovários dos insetos, possibilitando a transmissão transovariana do TYLCV (WEI et al., 2017; HE et al., 2021). Após o silenciamento de Vtg, o movimento de TYLCV foi inibido, interferindo tanto na aquisição quanto na eficiência da transmissão (WEI et al., 2017; HE et al., 2021). Sarkar & Ghanim (2022) identificaram uma interação entre Vtg do psílideo *Bactericera trigonica* com a proteína de membrana OmpA (*outer membrane protein*) e flagelina de CLso. Os autores relatam que Vtg estaria atuando como um receptor de reconhecimento de padrões (PRR), produzido em resposta aos fatores de virulência (OmpA e flagelina), e observaram que a concentração da bactéria aumenta conforme a Vtg é induzida. No entanto, a expressão de genes associados a autofagia é reprimida. Essa interação beneficiaria a persistência bacteriana no vetor, através de uma possível manipulação do sistema imune do inseto (SARKAR; GHANIM, 2022).

Neste trabalho, observamos uma tendência na repressão de Vtg em ácaros virulíferos para CiLV-C, porém, uma indução em resposta ao CoRSV. Na análise para verificar a possível resposta da hospedeira vegetal na expressão gênica dos ácaros, Vtg foi

significativamente induzido em ácaros mantidos em frutos de laranja doce, e reprimido na população avirulífera em cafeeiro (ANEXO A). Estudos da biologia de *B. yothersi* avirulíferos e virulíferos para CiLV-C não evidenciaram diferenças na longevidade entre as populações, porém, a fecundidade é maior em ácaros virulíferos; contudo, estudos sobre o desenvolvimento desses ácaros com o dichorhavirus CICSV mostraram um efeito contrário na presença do vírus, ou seja, redução na longevidade e fecundidade em relação a população avirulífera (TASSI et al., dados não publicados). Essa contradição na expressão de Vtg também foi observada em moscas-brancas, sendo Vtg reprimido após aquisição do crinivírus ToCV, e induzido após aquisição do begomovírus TYLCV (KAUR et al., 2017; DING et al., 2019; CATTO et al., 2022). Em *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae), Vtg também foi induzido em resposta ao tospovírus capsicum chlorosis virus (CaCV) (*Orthospovirus, Tospoviridae*) (WIDANA-GAMAGE et al., 2018; CATTO et al., 2022). Nos dois últimos casos, a indução de Vtg, mediada pela infecção viral, levou a um aumento na fecundidade dos insetos virulíferos (CATTO et al., 2022).

Tanto o begomovírus TYLCV quanto o tospovírus CaCV são transmitidos de maneira persistente propagativa por seus vetores (WEI et al., 2017; CATTO et al., 2022). Já a transmissão do crinivírus ToCV é semi-persistente, ou seja, sem replicação no vetor (CATTO et al., 2022). Com base nessas informações, parece haver consistência na indução de Vtg em resposta aos patógenos propagativos analisados, incluindo a bactéria CLso. Podemos sugerir que a indução de Vtg em ácaros virulíferos para CoRSV se deve a uma resposta ao vírus e, principalmente, ao tipo de interação, o que poderia favorecer o desenvolvimento dessa população de ácaros. Contudo, mais experimentos devem ser realizados para confirmar a relevância de Vtg na interação entre *B. yothersi* × VTB; principalmente, devido a ausência do corpo gorduroso em ácaros tenuipalpeados, o qual está intimamente associado na produção de vitelogenina.

A calreticulina (CRT) residente no lúmen do retículo endoplasmático (RE), responsável pelo armazenamento de cálcio, homeostase, adesão celular e regulação da expressão gênica, também possui potencial envolvimento na interação vírus-vetor (MICHALAK et al., 1999; CHEN et al., 2005). CRT de diferentes hospedeiras vegetais tem sido implicada no movimento intracelular de diversos vírus. Huang et al. (2023) relataram a associação de CRT de *N. benthamiana* (NbCRT) com TGBp3 (*triple-gene-block protein 3*) do bamboo mosaic virus (BaMV) (*Potexvirus, Alphaflexiviridae*), ocorrendo a formação de um complexo TGBp3-NbCRT, o qual se move ao longo de uma rede do RE até alcançar o plasmodesmo, facilitando o movimento viral célula-célula. Essa interação induz o estresse do

RE e UPR, o que leva a um aumento na expressão de NbCRT. Estudos também demonstraram que tobacco mosaic virus (TMV) (*Tobamovirus*, *Virgaviridae*) pode se locomover de uma célula para outra com auxílio de CRT, através da interação desta com a proteína de movimento (MP) (CHEN et al., 2005; HUANG et al., 2023).

Através de análises de co-imunoprecipitação (Co-IP) e espectrometria de massa (MS), associadas a análises bioinformáticas, foi potencialmente detectada a interação entre a P61 (uma possível glicoproteína) de CiLV-C com a proteína calnexina (CNX1) (ARENA et al., dados não publicados), localizada juntamente com a CRT e provável função similar, tanto na associação ao estresse do RE quanto na prevenção do dobramento correto de glicoproteínas (PASKEVICIUS et al., 2023). Arena et al. (2020) observaram que após expressão ectópica da P61 ou infecção por CiLV-C, genes marcadores da via UPR são induzidos, dentre eles, bZIP60 e CRT. Apesar dessas interações serem relatadas entre vírus e CRT de hospedeiras vegetais, nada impede que o mesmo ocorra entre vírus e CRT do artrópode vetor, particularmente para vírus que apresentem glicoproteínas (BARANDOC-ALVIAR et al., 2022). Estudos demonstraram que a proteína G do rhabdovírus maize mosaic virus (MMV) interage com as proteínas “cyclophilin A” (CypA) e “apolipoprotein III” (ApoLpIII) do seu vetor, a cigarrinha *P. maidis* (Hemiptera: Delphacidae) (BARANDOC-ALVIAR et al., 2022). No presente trabalho, o gene *CRT* teve sua expressão induzida em ácaros *B. yothersi* em resposta ao CiLV-C, e podemos hipotetizar que a P61 viral poderia interagir com a CRT do ácaro, além do mais, este gene foi significativamente reprimido nos ácaros avirulíferos em frutos de laranja, em relação aos avirulíferos em cafeeiro (ANEXO A). Em contrapartida, a expressão do gene *CRT* foi reprimida em resposta ao CoRSV.

Como os artrópodes estão em contato com diversos patógenos, é necessário um sistema imune eficiente para protegê-los contra infecções (KLOWDEN, 2013). Além do mais, a sobrevivência do vetor garante a transmissão viral, existindo adaptações entre vírus-vetor; porém, ainda são questionáveis os custos adaptativos para ativação das vias do sistema imune (CATTO et al., 2022).

Estudos com *B. tabaci* têm relatado que, após aquisição de TYLCCNV ou ToCV, genes relacionados à imunidade inata foram reprimidos, dentre eles, os associados à via de sinalização Toll (CATTO et al., 2022). Ao contrário do observado em moscas-brancas, genes da via Toll foram ativados em tripes após aquisição de TSWV (LUAN et al., 2011; CATTO et al., 2022). Com a repressão das vias de sinalização e, conseqüentemente, repressão da imunidade, os vírus poderiam circular com mais facilidade no vetor (CATTO et al., 2022). Contudo, Luan et al. (2011) relataram que genes relacionados a autofagia são induzidos em *B.*

*tabaci* em resposta a TYLCCNV, como uma estratégia do sistema imune do vetor para equilibrar os efeitos nocivos do vírus. Em relação a *B. yothersi*/VTBs, observamos que os genes relacionados à imunidade inata, principalmente aqueles relacionados às vias de sinalização Toll, IMD e JNK, foram reprimidos em resposta aos dois VTBs. A seleção desses genes foi realizada com base na busca por ortólogos de *T. urticae*, embora verificada como vias incompletas, uma vez que o genoma de *T. urticae* abriga apenas uma fração dos genes encontrados em *Drosophila melanogaster* (GRBIC et al., 2011). A ausência de componentes *upstream* da via IMD também foi relatada para outros invertebrados como pulgões, abelhas e aracnídeos. Estudos sugerem ser uma característica geral e ancestral e que estes organismos se utilizam de outros mecanismos para constituir sua resposta imune (GRBIC et al., 2011; BECHSGAARD et al., 2016).

Ao contrário do observado para os genes da via Toll e IMD, genes da via JAK/STAT, conhecida pela ativação em resposta antiviral (BECHSGAARD et al., 2016) foram significativamente induzidos em resposta ao CiLV-C, e apresentaram tendência de indução em resposta ao CoRSV. Podemos inferir que a via atuaria na defesa de *B. yothersi* contra um possível efeito deletério do vírus, uma vez que as demais vias são reprimidas, garantindo um equilíbrio entre vírus e vetor. Estudos com arbovírus têm relatado a importância da via JAK/STAT dos mosquitos vetores contra infecções virais, restringindo e limitando a disseminação viral no intestino dos insetos (CHENG et al., 2016). Em *B. tabaci*, a infecção por TYLCV reduz sua fecundidade e longevidade (WANG et al., 2022). Em resposta a essa infecção, tanto a via de autofagia quanto a via de sinalização JAK/STAT são ativadas, restringindo o acúmulo viral (WANG et al., 2022). Os autores relataram que, em um processo de contra-ataque, o vírus inibe a via JAK/STAT para alcançar a eficiência de transmissão, através da ligação da CP-TYLCV ao gene Stat do vetor, bloqueando a sua translocação até o núcleo, e assim inibindo a transcrição mediada pela Stat. Os resultados suportam a ideia de um mecanismo de adaptação entre TYLCV e *B. tabaci* para mediar o equilíbrio entre sobrevivência do vetor e transmissão do vírus (WANG et al., 2022).

O mecanismo de silenciamento de RNA é outra via importante na defesa antiviral, sendo essencial no controle da carga viral dentro do vetor (CATTO et al., 2022). Aqui, observamos que o gene *AGO2* foi significativamente induzido em *B. yothersi* em resposta ao CiLV-C e, apesar da ausência de enzimas DCL2, responsável pelo reconhecimento e clivagem do dsRNA viral, poderíamos especular que o cilevírus ativa a via de silenciamento. Contudo, devido a anotação do genoma do ácaro não estar completa, novas buscas por genes pertencentes ao mecanismo de silenciamento e novas análises devem ser realizadas.

Uma contraposição na expressão dos genes da via UPR foi observada para os diferentes VTBs. Os genes de UPR foram induzidos em resposta ao cilevírus, porém, reprimidos em resposta ao dichorhavirus. Ativação da via UPR foi observada em *I. scapularis*, restringindo a colonização das bactérias *B. burgdorferi* e *A. phagocytophilum* (ROSCHE et al., 2021; SIDAK-LOFTIS et al., 2022). A via UPR é altamente conservada entre as espécies e sua ativação é em decorrência do estresse sofrido pelo RE. As proteínas mal enoveladas se acumulam no lúmen do RE, levando a ativação da via UPR, a qual pode ser desencadeada através da ativação dos receptores PERK, ATF6 e IRE1 $\alpha$ , após dissociação da proteína reguladora BiP (ROSCHE et al., 2021).

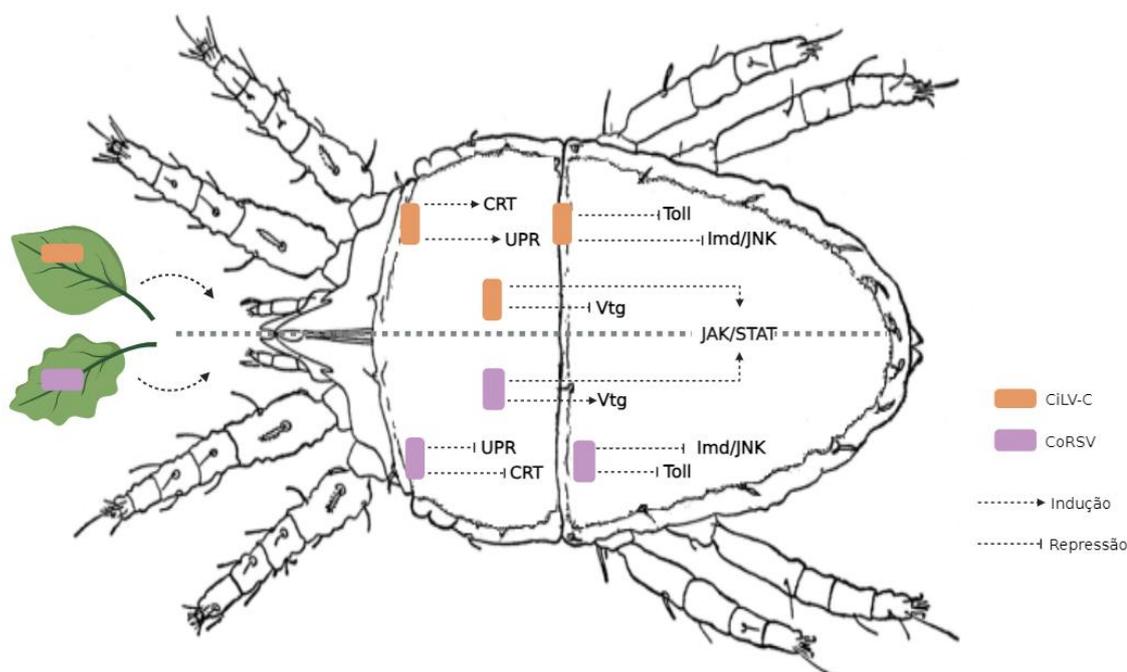
Sidak-Loftis et al. (2022) mostraram que o eixo IRE1 $\alpha$ -TRAF2 é uma rota alternativa para a ativação da via IMD; porém, o gene para Xbp1 não foi induzido. Contudo, trabalhos relataram que a interação entre *I. scapularis* e *A. phagocytophilum* levou à indução dos genes IRE1 $\alpha$ , TRAF2 e Xbp1 (YOSHIKAWA et al., 2020). Após ativação de IRE1 $\alpha$ , este se autofosforila e induz o *splicing* do RNAm Xbp1 (Xbp1<sup>S</sup> - *spliced*), que é traduzido e translocado para o núcleo, funcionando como um fator de transcrição. Todavia, quando Xbp1 não sofre *splicing* (Xbp1<sup>U</sup> - *unspliced*) é mantido em um estado inativo, reprimindo a via ao formar uma estrutura em grampo (*harpin*) (ROSCHE et al., 2021; SIDAK-LOFTIS et al., 2022).

Este é o primeiro trabalho a analisar genes da via UPR envolvendo a interação entre ácaro fitófago em resposta a vírus. Em resposta ao cilevírus CiLV-C, os três genes associados a via UPR (IRE1 $\alpha$ , TRAF2 e Xbp1) e o gene CRT, também ativado em resposta ao estresse do RE e UPR, foram induzidos em *B. yothersi*. Em contrapartida, esses genes foram significativamente reprimidos em resposta ao dichorhavirus CoRSV. Interessantemente, o regulador de via (Xbp1) foi induzido em *B. yothersi* em resposta ao CiLV-C, sugerindo que a UPR para cilevírus é diferente da resposta observada na interação entre carrapatos e bactérias (SIDAK-LOFTIS et al., 2022).

Através do ensaio biológico com peróxido de hidrogênio, observamos maior mortalidade de ácaros das populações virulíferas para ambos os VTBs. Isso sugere que os ácaros virulíferos podem ser mais vulneráveis contra compostos tóxicos. Esse resultado corrobora as principais análises quantitativas para os genes associados à detoxificação de ROS, os quais tiveram sua expressão reprimida em ácaros *B. yothersi* em resposta aos VTBs. Apesar da maior mortalidade observada em ácaros virulíferos, a oviposição de *B. yothersi* pode ser favorecida em resposta ao CiLV-C (ARENA et al., 2016), como uma forma de compensação para o equilíbrio populacional. Contudo, não foi possível realizar análise de

expressão gênica dos ácaros sobreviventes nesse ensaio, devido à baixa concentração de RNA extraído. Sendo assim, para esta avaliação quantitativa, após a entrega artificial de peróxido de hidrogênio, faz-se necessário um experimento biológico com um número maior de repetições biológicas e ácaros, para cada condição (VTB) e concentração da solução.

Em suma, a análise da expressão gênica de *B. yothersi* sugere alterações transcricionais diferenciais em resposta aos VTBs (Figura 29). As respostas quantitativas encontradas foram semelhantes àsquelas encontradas no transcriptoma de *A. tosicHELLa* em resposta ao WSMV, sugerindo que a repressão de genes associados a detoxificação, imunidade inata e desenvolvimento teria um sentido evolutivo uma vez que, em *A. tosicHELLa*, o número de descendentes foi aumentado em decorrência de possível ameaça pela infecção viral (GUPTA et al., 2019), similar ao observado em *B. yothersi* após aquisição de CiLV-C (ARENA et al., 2016). Portanto, apesar do perfil de expressão de grande número de genes ser similar em resposta a CiLV-C e CoRSV, diferenças significativas e interessantes foram encontradas entre as vias de resposta imune, dando suporte para a especificidade das interações entre *B. yothersi* e diferentes VTBs.



**Figura 29** - Ilustração da interação entre *Brevipalpus yothersi* × VTBs. Os lados direito e esquerdo do ácaro, separados pela linha tracejada, apresentam as vias induzidas e reprimidas em resposta ao cilevírus CiLV-C e ao dichorvírus CoRSV, respectivamente. Após aquisição de células vegetais contendo partículas de CiLV-C e, consequentemente, moléculas de ROS, os genes relacionados as vias do sistema imune inato (Imd, JNK e Toll) e o gene Vtg são reprimidos, todavia, a via de resposta à infecção viral JAK/STAT, via de UPR e o gene CRT são induzidos em resposta ao CiLV-C. Em decorrência da aquisição de partículas de CoRSV, as vias do sistema imune inato (Imd, JNK e Toll), via de UPR e o gene CRT são reprimidos, enquanto a via JAK/STAT e o gene Vtg são induzidos em resposta ao dichorvírus. Ilustração criada na plataforma BioRender.

## 7 CONCLUSÕES

- 1) Este trabalho foi pioneiro em informações sobre a genética funcional de *B. yothersi* em resposta aos VTBs CiLV-C e CoRSV ao validar genes relacionados a detoxificação, interação vírus-vetor e vias de resposta imune;
- 2) Foi possível identificar os genes de referência EF1 $\alpha$  e UBQ como normalizadores para estudos envolvendo a interação entre *B. yothersi* e dichorhavirus;
- 3) A maioria dos genes associados aos processos de detoxificação de xenobióticos e interação vírus-vetor foram reprimidos para ambos os VTBs. As exceções foram os genes *CCE* e *Vtg*, respectivamente induzidos em resposta ao CiLV-C e CoRSV;
- 4) Genes relacionados às vias de sinalização Toll, IMD e JNK foram reprimidos em *B. yothersi* em resposta a ambos os VTBs. Para a via de sinalização JAK/STAT os genes foram induzidos em resposta ao CiLV-C e não foram observadas diferenças significativas na resposta ao CoRSV. O gene *AGO2* é induzido em resposta ao CiLV-C, mas não difere entre os tratamentos em cafeeiro. Podemos sugerir que as vias de resposta antiviral atuam na proteção do vetor contra possíveis efeitos adversos causados pelos vírus;
- 5) A presença dos VTBs modula a expressão de genes associados ao estresse do RE e UPR, havendo indução em resposta ao cilevírus CiLV-C e repressão em resposta ao dichorhavirus CoRSV;
- 6) A repressão de genes relacionados a detoxificação de ROS foi corroborada pela maior mortalidade de ácaros *B. yothersi* virulíferos para CiLV-C e CoRSV, após ingestão de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.

## REFERÊNCIAS

Abbas, A. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier, 2012.

ALBERTI, G.; COONS, L.B. Acari: mites. **Microscopic Anatomy of Invertebrates**, v. 8, p. 515-1265, 1999.

Alberti, G., Tassi, A.D., Kitajima, E.W. Male reproductive system. In: Alberti G. & Kitajima E.W. (eds): **Anatomy and fine Structure of *Brevipalpus* Mites (Tenuipalpidae, Prostigmata, Actinotrichida)**. Part 5. Stuttgart: Zoologica, 2014a. 160p.

Alberti, G.; de Andrade, D.; Garita, L.C.; Kitajima, E.W. Digestive system. In: Alberti, G. & Kitajima, E.W. (eds.): **Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae, Prostigmata, Actinotrichida)**. Part 3. Stuttgart: Zoologica, 2014b. 160p.

Altendorf, S. **Minor tropical fruits: Mainstreaming a niche market**. Food Outlook. FAO, 2018.

Amezian, D.; Nauen, R.; Le Goff, G. Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification genes in insects – An overview. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 174: 104822, 2021. doi:10.1016/j.pestbp.2021.104822.

Andrade, D.J.; Lorençon, J.R.; Siqueira, D.S.; Novelli, V.M.; Bassanezi, R.B. Space-time variability of citrus leprosis as strategic planning for crop management. **Pest Management Science** 74: 1798-1803, 2018. doi:10.1002/ps.4877.

Andersen, C.L.; Jensen, J.L.; Orntoft, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research** 64(15): 5245-5250, 2004.

Antonioli-Luizon, R. **Sequenciamento parcial do vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus – PFGSV), desenvolvimento de métodos para sua detecção e estudos sobre sua variabilidade genética**. 2009, 70 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

Arbouzova, N.I.; Zeidler, M.P. JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. **Development** 133: 2605-2616, 2006. doi:10.1242/dev.02411.

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** 7(1757): 1-17, 2016.

Arena, G.D.; Ramos-González, P.L.; Rogerio, L.A.; Ribeiro-Alves, M.; Casteel, C.L.; Freitas-Astúa, J.; Machado, M.A. Making a better home: modulation of plant defensive response by *Brevipalpus* mites. **Frontiers in Plant Science** 9:1147, 2018. doi:10.3389/fpls.2018.01147.

Arena, G.D.; Ramos-González, P.L.; Falk, B.W., Casteel, C.L.; Freitas-Astúa, J.; Machado, M.A. Plant immune system activation upon citrus leprosis virus C infection is mimicked by the ectopic expression of the P61 viral protein. **Frontiers in Plant Science** 11: 1188, 2020. doi:10.3389/fpls.2020.01188.

Arena, G.D.; Ramos-González, P.L.; Tassi, A.D.; Machado, M.A.; Freitas-Astúa, J. A TaqMan RT-qPCR assay for absolute quantification of citrus leprosis virus C lineage SJP: disclosing the subgenomic/genomic ratio in plant and mite vector, plant organ-specific viral loads, and the kinetics of viral accumulation in plants. **Tropical Plant Pathology** 48(1): 30-41, 2023. doi:10.1007/s40858-022-00539-4.

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 ulmi* using strand-specific RNA-Seq. **BMC Genomics** 16(1): 1-26, 2015.

Barandoc-Alviar, K., Rotenberg, D.; Martin, K.M.; Whitfield, A.E. The physical interactome between *Peregrinus maidis* proteins and the maize mosaic virus glycoprotein provides insights into the cellular biology of a rhabdovirus in the insect vector. **Virology** 577: 163-173, 2022. doi:10.1016/j.virol.2022.10.002.

Barbosa, M.R.; Silva, M.M.A.; Willadino, L.; Ulisses, C.; Camara, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, 44(3): 453-460, 2014.

Bassanezi, R.B.; Czermainski, A.B.C.; Laranjeira, F.F.; Moreira, A.S.; Ribeiro Jr., P.J.; Krainski, E.T.; Amorin, L. Spatial patterns of the citrus leprosis virus and its associated mite vector in systems without intervention. **Plant Pathology** 68: 85-93, 2019. doi:10.1111/ppa.12930.

Bastianel, M.; Freitas-Astúa, J.; Kitajima, E.W.; Machado, M.A. The citrus leprosis pathosystem. **Summa Phytopathologica** 32(3): 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** 94(3): 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** 3944(1): 001-067, 2015.

Bechsgaard, J.; Vanthournout, B.; Funch, P.; Vestbo, S.; Gibbs, R.A.; Richards, S.; Sanggaard, K.W.; Enghild, J.J.; Bilde, T. Comparative genomic study of arachnid immune systems indicates loss of beta-1,3-glucanase-related proteins and the immune deficiency pathway. **Journal of Evolutionary Biology** 29: 277-291, 2016. doi:10.1111/jeb.12780.

Bitancourt, A.A. A mancha anular, uma nova doença do cafeeiro. **O Biológico** 4: 404-405, 1938.

Bittner, N.; Trauer-Kizilelma, U.; Hilker, M. Early plant defence against insect attack: involvement of reactive oxygen species in plant responses to insect egg deposition. **Planta** 245: 993-1007, 2017. doi:10.1007/s00425-017-2654-3.

Blanc, S.; Drucker, M.; Uzest, M. Localizing viruses in their insect vectors. **Annual Review of Phytopathology** 52: 403-425, 2014. doi:10.1146/annurev-phyto-102313-045920.

Boari, A.J.; Figueira, A.R.; Neder, D.G.; Infiesta, L.R.; Nogueira, N.L.; Rossi, M.L.; Kitajima, E.W. Efeito da temperatura na infecção sistêmica de *Chenopodium quinoa* pelo Coffee ringspot virus (CoRSV). **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, 28, supl., 2003.

Boari, A.J.; Freitas-Astúa, J.; Ferreira, P.T.O.; Neder, D.G.; Nogueira, N.L.; Rossi, M.L.; Kitajima, E.W. Purification and serology of the coffee ringspot virus. **Summa Phytopathologica** 30(4): 453-458, 2004.

Boari, A.J.; Figueira, A.R.; Neder, D.G.; Santos, R.C.; Goussain, M.M.; Nogueira, N.L.; Rossi, M.L. Vírus da mancha anular do cafeeiro (Coffee ringspot virus - CoRSV): influência na qualidade da bebida e na produção de grãos de café. **Summa Phytopathologica** 32(2): 192-194, 2006.

Boari, A.J. **Mancha anular do cafeeiro (Coffee ringspot virus – CoRSV)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2011. 43 p.

Castro, E.B.; Mesa, N.C.; Feres, R.J.F.; de Moraes, G.J.; Ochoa, R.; Beard, J.J.; Demite, P.R. A newly available database of an important family of phytophagous mites: Tenuipalpidae Database. **Zootaxa** 4868(4): 577-583, 2020. doi:10.11646/zootaxa.4868.4.7.

Catto, M.A.; Mugerwa, H.; Myers, B.K.; Pandey, S.; Dutta, B.; Srinivasan, R. A review on transcriptional responses of interactions between insect vectors and plant viruses. **Cells** 11: 693, 2022. doi:10.3390/cells11040693.

Chabi-Jesus, C.; Ramos-González, P.L.; Tassi, A.D.; Guerra-Peraza, O.; Kitajima, E.W.; Harakava, R.; Beserra Jr., J.E.A.; Salaroli, R.B.; Freitas-Astúa, J. Identification and characterization of citrus chlorotic spot virus, a new Dichorhavirus associated with citrus leprosis-like symptoms. **Plant Disease** 102(8): 1588-1598, 2018. doi:10.1094/PDIS-09-17-1425-RE.

Chabi-Jesus, C.; Ramos-González, P.L.; Postclam-Barro, M.; Fontenele, R.S.; Harakava, R.; Bassanezi, R.B.; Moreira, A.S.; Kitajima, E.W.; Varsani, A.; Freitas-Astúa, J. Molecular epidemiology of citrus leprosis C: a new viral lineage and phylodynamic of the main viral subpopulations in the Americas. **Frontiers in Microbiology** 12: 641252, 2021. doi:10.3389/fmicb.2021.641252.

Chabi-Jesus, C.; Ramos-González, P.L.; Tassi, A.D.; Pereira, L.R.; Bastianel, M.; Lau, D.; Canale, M.C.; Harakava, R.; Novelli, V.M.; Kitajima, E.W.; Freitas-Astúa, J. Citrus Bright spot virus: a new Dichorhavirus, transmitted by *Brevipalpus azores*, causing citrus leprosis disease in Brazil. **Plants** 12: 1731, 2023. doi:10.3390/plants12061371.

Chen, M.H.; Tian, G-W.; Gafni, Y.; Citovsky, V. Effects of calreticulin on viral cell-to-cell movement. **Plant Physiology** 138: 1866-1876, 2005.

Cheng, G.; Liu, Y.; Wang, P.; Xiao, X. Mosquito defense strategies against viral infection. **Trends in Parasitology** 32(3): 177-186, 2016. doi:10.1016/j.pt.2015.09.009.

Chiavegato, L.G. Aspectos biológicos e transmissão de leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em citros. **Laranja** 17: 229-295, 1996.

Childers, C.C.; Derrick, K.S. *Brevipalpus* mites as vectors of unassigned rhabdoviruses in various crops. **Experimental and Applied Acarology** 30: 1-3, 2003.

Childers, C.C.; Rodrigues, J.C.V. An overview of *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae) and the plant viruses they transmit. **Zoosymposia** 6: 180-192, 2011.

Choy, R.K.M.; Kemmer, J.M.; Thomas, J.H. Fluoxetine-resistance genes in *Caenorhabditis elegans* function in the intestine and may act in drug transport. **Genetics** 172(2): 885-892, 2006. doi: 10.1534/genetics.103.024869.

CITRUSBR. Associação Nacional dos Exportadores de sucos cítricos (2023a). Disponível em: <<https://citrusbr.com/estatisticas/exportacoes/>>. Acesso em: 03 maio 2023.

CITRUSBR. Associação Nacional dos Exportadores de sucos cítricos (2023b). Disponível em: <<https://citrusbr.com/noticias/safra-de-laranja-2022-23-e-encerrada-com-producao-total-de-31421-milhoes-de-caixas>>. Acesso em: 03 maio 2023.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. (2023). **Acompanhamento da safra Brasileira de café**. Disponível em:

<[http://www.consorcioquesquisacafe.com.br/images/stories/noticias/2021/2023/Janeiro/1\\_levantamento\\_safra\\_conab.pdf](http://www.consorcioquesquisacafe.com.br/images/stories/noticias/2021/2023/Janeiro/1_levantamento_safra_conab.pdf)>. Acesso em: 03 maio 2023.

Cook, G.; Kirkman, W.; Clase, R.; Steyn, C.; Basson, E.; Fourie, P.H.; Moore, S.D.; Grout, T.G.; Carstens, E.; Hattingh, V. Orchid fleck virus associated with the first case of citrus leprosis-N in South Africa. **European Journal of Plant Pathology** 155(4): 1373-1379, 2019. doi:10.1007/s10658-019-01854-4.

Da Costa-Rodrigues, M.; Rossetto Pereira, L.; Ramos-González, P.L.; Chabi-Jesus, C.; Tassi, A.D.; Leão, I.G.; Harakava, R.; Kitajima, E.W.; Freitas-Astúa, J. First report of *Passion fruit green spot virus* infecting hibiscus plants. **New Disease Reports** 45: e12080, 2022. doi:10.1002/ndr2.12080.

Dáder, B.; Then, C.; Berthelot, E.; Ducouso, M.; Ng, J.C.K.; Drucker, M. Insect transmission of plant viruses: multilayered interaction optimize viral propagation. **Insect Science** 24(6): 929-946, 2017. doi:10.1111/1744-7917.12470.

De Lillo, E.; Pozzebon, A.; Valenzano, D.; Duso, C. An intimate relationship between eriophyoid mites and their host plants – a review. **Frontiers in Plant Science** 9: 1786, 2018. doi:10.3389/fpls.2018.01786.

De Lillo, E.; Freitas-Astúa, J.; Kitajima, E.W.; Ramos-González, P.L.; Simoni, S.; Tassi, A.D.; Valenzano, D. Phytophagous mites transmitting plant viruses: update and perspectives. **Entomologia Generalis** 41(5): 439-462, 2021. doi:10.1127/entomologia/2021/1283.

Della Vechia, J.F.; Ferreira, M.C.; Andrade, D.J. Interaction of spirodiclofen with insecticides for the control of *Brevipalpus yothersi* in citrus. **Pest Management Science** 74(11): 2438-

2443, 2018. doi:10.1002/ps.4918.

Della Vecchia, J.F.; Bassanezi, R.; Andrade, D.J. Physiochemical and biological compatibility of insecticide mixtures with acaricide in the management of *Brevipalpus yothersi*. **Systematic and Applied Acarology** 24(8): 1455-1464, 2019. doi:10.11158/saa.24.8.8.

Della Vecchia, J.F.; Zanardi, O.Z.; Kapp, A.B.P.; Bassanezi, R.B.; de Andrade, D.J. Lethal and sublethal effects of insecticides on the survival and reproduction of *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae). **Experimental and Applied Acarology** 85: 191-204, 2021. doi:10.1007/s10493-021-00672-w.

De Rouck, S.; Inak, E.; Dermauw, W.; van Leeuwen, T. A review of the molecular mechanisms of acaricide resistance in mites and ticks. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, p. 103981, 2023. doi:10.1016/j.ibmb.2023.103981.

Dietzgen, R.G.; Kuhn, J.H.; Clawson, A.N.; Freitas-Astúa, J.; Goodin, M.M.; Kitajima, E.W.; Kondo, H.; Wetzell, T.; Whitfield, A.E. Dichorhavirus: a proposed new genus for *Brevipalpus* mite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. **Archives of Virology** 159(3): 607-619, 2014.

Dietzgen, R.G.; Mann, K.S.; Johnson, K.N. Plant virus-insect vector interactions: current and potential future research directions. **Viruses** 8(11): 303, 2016. doi:10.3390/v8110303.

Dietzgen, R.G.; Freitas-Astúa, J.; Chabi-Jesus, C.; Ramos-González, P.L.; Goodin, M.M.; Kondo, H.; Tassi, A.D.; Kitajima, E.W. Dichorhaviruses in their host plants and mite vectors. **Advances in Virus Research** 102, 119-148, 2018. doi:10.1016/bs.aivir.2018.06.001.

Ding, T-B.; Li, J.; Chen, E-H.; Niu, J-Z.; Chu, D. Transcriptome profiling of the whitefly *Bemisia tabaci* MED in response to single infection of tomato yellow leaf curl virus, tomato chlorosis virus, and their co-infection. **Frontiers in Physiology** 10: 302, 2019. doi:10.3389/fphys.2019.00302.

Doi, Y.; Chang, M.U.; Yora, K. *Orchid fleck virus*. **Descriptions of plant viruses** 183: 1-3, 1977.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2023). **Markets and Trade: Coffee**. Disponível em: < <https://www.fao.org/markets-and-trade/commodities/coffee/en/>>. Acesso em: 03 maio 2023.

Ferreira, L.M.; Nunes, M.A.; Sinico, T.E.; Soares, A.J.; Novelli, V.M. *Brevipalpus* species vectoring citrus leprosis virus (*Cilevirus* and *Dichorhavirus*). **Journal of Economic Entomology** 113(4): 1628-1634, 2020. doi:10.1093/jee/toaa070.

Freitas-Astúa, J.; Ramos-González, P.L.; Arena, G.D.; Tassi, A.D.; Kitajima, E.W. *Brevipalpus*-transmitted viruses: parallelism beyond a common vector or convergent evolution of distantly related pathogens? **Current Opinion in Virology** 33: 66-73, 2018. doi:10.1016/j.coviro.2018.07.010.

Fundecitrus – Fundo de Defesa da Citricultura. (2023a). **Inventário de árvores e estimativa da safra de laranja do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro**.

Disponível em:

<[https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes\\_relatorios/2023\\_05\\_10\\_Sum%C3%A1rio\\_Executivo\\_da\\_Estimativa\\_da\\_Safra\\_de\\_Laranja\\_2023-2024.pdf](https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2023_05_10_Sum%C3%A1rio_Executivo_da_Estimativa_da_Safra_de_Laranja_2023-2024.pdf)>. Acesso em 11 maio 2023.

Fundecitrus – Fundo de Defesa da Citricultura. (2023b). **Reestimativa da safra de laranja 2022/23 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro – Fechamento em abril/2023**. Disponível em:

<[https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes\\_relatorios/0423\\_Fechamento\\_da\\_Safra\\_de\\_Laranja.pdf](https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0423_Fechamento_da_Safra_de_Laranja.pdf)>. Acesso em 03 maio 2023.

Gall, V.L.L.; Klafke, G.M.; Torres, T.T. Detoxification mechanisms involved in ivermectin resistance in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Scientific Reports** 8: 12401, 2018. doi:10.1038/s41598-018-30907-7.

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** 39(1): 43-55, 2014.

Ghosh, S.; Ghanim, M. Factors determining transmission of persistent viruses by *Bemisia tabaci* and emergence of new virus-vector relationships. **Viruses** 13(9): 1808, 2021. doi:10.3390/v13091808.

Gibbs, A.; Mackenzie, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virology** 63: 9-16, 1997.

González-González, A.; Wayne, M.L. Immunopathology and immune homeostasis during viral infection in insects. **Advances in Virus Research** 107: 285-314, 2020. doi:10.1016/bs.aivir.2020.06.001.

Goodin, M.; Figueira, A.R. Good to the last drop: The emergence of coffee ringspot virus. **PLoS Pathogens** 15(1): e1007462, 2019.

Gorovits, R.; Czosnek, H. The involvement of heat shock proteins in the establishment of tomato yellow leaf curl virus infection. **Frontiers in Plant Science** 8:355, 2017. doi:10.3389/fpls.2017.00355.

Grbic, M. et al. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. **Nature** 479: 487-492, 2011.

Groot T.V.M.; Breeuwer J.A.J. *Cardinium* symbionts induce haploid thelytoky in most clones of three closely related *Brevipalpus* species. **Experimental and Applied Acarology** 39: 257-271, 2006.

Gupta, A.K.; Scully, E.D.; Palmer, N.A.; Geib, S.M.; Sarath, G.; Hein, G.L.; Tatineni, S. Wheat streak mosaic virus alters the transcriptome of its vector, wheat curl mite (*Aceria tosichella* Keifer), to enhance mite development and population expansion. **Journal of General Virology** 100(5): 1-22, 2019. doi:10.1099/jgv.0.001256.

Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** 41: 95-98, 1999.

Haramoto, F.H. Biology and control of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acarina: Tenuipalpidae). Honolulu: **Hawaii Agricultural Experimental Station**, 1969. 63 p.

He, Y-J.; Lu, G.; Qi, Y-H.; Zhang, Y.; Zhang, X-D.; Huang, H-J.; Zhuo, J-C.; Sun, Z-T.; Yan, F.; Chen, J-P.; Zhang, C-X.; Li, J-M. Activation of Toll immune pathway in an insect vector induced by a plant virus. **Frontiers in Immunology** 11: 613957, 2021. doi:10.3389/fimmu.2020.613957.

He, Y-Z.; Wang, Y-M.; Yin, T-Y.; Cuellar, W.J.; Liu, S-S.; Wang, X-W. Gut-expressed vitellogenin facilitates the movement of a plant virus across the midgut wall in its insect vector. **mSystems** 6(3): e00581-21, 2021. doi:10.1128/mSystems.00581-21.

Huang, Y-W.; Sun, C-I.; Hu, C-C.; Tsai, C-H.; Meng, M.; Lin, N-S.; Dinesh-Kumar, S.P.; Hsu, Y-H. A viral movement protein co-opts endoplasmic reticulum luminal-binding protein and calreticulin to promote intracellular movement. **Plant Physiology** 191: 904-924, 2023. doi:10.1093/plphys/kiac547.

Iftikhar, Y.; Ullah, M.I.; Sajida, A.; Bakhtawar, F. Virus-vector interaction and transmission in plants. **Plant RNA Viruses**. Academic Press, 2023. p. 273-284. doi:10.1016/B978-0-323-95339-9.00011-9.

INCAPER - Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. (2023). **Cadeia produtiva do maracujá no Espírito Santo**. Disponível em: <<https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/item/4436/1/Livro-cadeiaprodutivadomaracuja-Incaper.pdf>>. Acesso em: 11 julho 2023.

Jassar, O.; Ghanim, M. Association of endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD) with the transmission of *Liberibacter solanacearum* by its psyllid vector. **Insect Molecular Biology** 2023. doi:10.1111/imb.12842.

Kanakala, S.; Kontsedalov, S.; Lebedev, G.; Ghanim, M. Plant-mediated silencing of the whitefly *Bemisia tabaci* cyclophilin B and heat shock protein 70 impairs insect development and virus transmission. **Frontiers in Physiology** 10: 557, 2019. doi:10.3389/fphys.2019.00557.

Kaur, N.; Chen, W.; Zheng, Y.; Hasegawa, D.K.; Ling, K.S.; Fei, Z.; Wintermantel, W.M. Transcriptome analysis of the whitefly, *Bemisia tabaci* MEAM1 during feeding on tomato infected with the crinivirus, Tomato chlorosis virus, identifies a temporal shift in gene expression and differential regulation of novel orphan genes. **BMC Genomics** 18: 370, 2017. doi:10.1186/s12864-017-3751-1.

Kietz, C.; Meinander, A. *Drosophila* caspases as guardians of host-microbe interactions. **Cell Death & Differentiation** 30: 227-236, 2022. doi:10.1038/s41418-022-01038-4.

Kingsolver, M.B.; Huang, Z.; Hardy, R.W. Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. **Journal of Molecular Biology** 425(24): 4921-4936, 2013. doi:10.1016/j.jmb.2013.10.006.

Kitajima, E.W.; Muller, G.W.; Costa, A.S.; Yuki, W. Short, rod-like particles associated with

citrus leprosis. **Virology** 50(1): 254-258, 1972.

Kitajima, E.W.; Costa, A.S. Partículas baciliformes associadas à mancha anular do cafeeiro. **Ciência e Cultura** 24: 542-545, 1972.

Kitajima, E.W.; Blumenschein, A.; Costa, A.S. Rodlike particles associated with ringspot symptoms in several orchid species in Brazil. **Journal of Phytopathology** 81(3): 280-286, 1974.

Kitajima, E.W.; Rezende, J.A.M.; Rodrigues, J.C.V.; Chiavegato, L.G.; Piza Jr.; C.T.; Morozini, W. Green spot of passion fruit, a possible viral disease associated with infestation by the mite *Brevipalpus phoenicis*. **Fitopatologia Brasileira** 22(4): 555-559, 1997.

Kitajima, E.W.; Kondo, H.; Mackenzie, A.; Rezende, J.A.M.; Gioria, R.; Gibbs, A.; Tamada, T. Comparative cytopathology and immunocytochemistry of Japanese, Australian and Brazilian isolates of orchid fleck virus. **Journal of General Plant Pathology** 67(3): 231-237, 2001. doi:10.1007/PL00013018.

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** 30: 135-160, 2003.

Kitajima, E.W.; Kubo, K.S.; Ferreira, P.T.O.; Alcântara, B.K.; Boari, A.J.; Gomes, R.T.; Freitas-Astúa, J.; Rezende, J.A.M.; Morais, G.J.; Salaroli, R.B. Chlorotic spots on *Clerodendrum*, a disease caused by a nuclear type of *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) transmitted virus. **Scientia Agricola** 65(1): 36-49, 2008.

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** 67(3): 348-371, 2010.

Kitajima, E.W.; Chagas, C.M.; Braghini, M.T.; Fazuoli, L.C.; Locali-Fabris, E.C.; Salaroli, R.B. Natural infection of several *Coffea* species and hybrids and *Psilanthus ebracteolatus* by the coffee ringspot virus (CoRSV). **Scientia Agricola** 68(4): 503-507, 2011.

Kitajima, E.W.; Alberti, G. Ultrastructural detection of cytoplasmic and nuclear types of *Brevipalpus*-transmitted viruses. In: Alberti, G. & Kitajima, E.W. (eds.): **Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae, Prostigmata, Actinotrichida)**. Part 7. Stuttgart: Zoologica, 2014. 160p.

Kitajima, E.W.; Novelli, V.M.; Alberti, G. An update on the biology and economic importance of *Brevipalpus* mites. In: Alberti, G. & Kitajima, E.W. (eds.): **Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* Mites (Tenuipalpidae, Prostigmata, Actinotrichida)**. Part 1. Stuttgart: Zoologica, 2014. 160p.

Klowden, M.J. **Physiological systems in insects**. Academic press, 2013.

Kondo, H.; Maeda, T.; Tamada, T. Orchid fleck virus: *Brevipalpus californicus* mite transmission, biological properties and genome structure. **Experimental and Applied Acarology** 30: 215-223, 2003.

Kondo, H.; Hirota, K.; Maruyama, K.; Andika, I.B.; Suzuki, N. A possible occurrence of genome reassortment among bipartite rhabdoviruses. **Virology** 508: 18-25, 2017. doi:10.1016/j.virol.2017.04.027.

Kozera, B.; Rapacz, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics** 54(4): 391-406, 2013.

Kubo, K.S.; Novelli, V.M.; Bastianel, M.; Locali-Fabris, E.C.; Antonioli-Luizon, R.; Machado, M.A.; Freitas-Astúa, J. Detection of *Brevipalpus*-transmitted viruses in their mite vectors by RT-PCR. **Experimental and Applied Acarology** 54: 33-39, 2011. doi:10.1007/s10493-011-9425-9.

Kumar, A.; Srivastava, P.; Sirisena, P.D.N.N.; Dubey, S.K.; Kumas, R.; Shrinet, J.; Sunil, S. Mosquito innate immunity. **Insects** 9(3): 95, 2018. doi:10.3390/insects9030095.

Leastro, M.O.; Castro, D.Y.O.; Freitas-Astúa, J.; Kitajima, E.W.; Pallás, V.; Sánchez-Navarro, J.A. Citrus leprosis virus C encodes three proteins with gene silencing suppression activity. **Frontiers in Microbiology** 11: 1231, 2020. doi:10.3389/fmicb.2020.01231.

Lee, W-S.; Webster, J.A.; Madzokere, E.T.; Stephenson, E.B.; Herrero, L.J. Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. **Parasites Vectors** 12: 165, 2019. doi:10.1186/s13071-019-3433-8.

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** 121: 12-21, 2015.

Leeuwen, T.V.; Dermauw, W. The molecular evolution of xenobiotic metabolism and resistance in chelicerate mites. **Annual Review of Entomology** 61: 475-498, 2016.

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** 92: 1364, 2008.

Li, H.; Zhang, S. Functions of vitellogenin in eggs. **Results and Problems in Cell Differentiation** 63: 389-401, 2017. doi:10.1007/978-3-319-60855-6\_17.

Li, M.; Zhao, J.; Su, Y-L. Transcriptome analysis of gene expression profiles of tomato yellow leaf curl virus-infected whiteflies over different viral acquisition access periods. **Insect** 11: 297, 2020. doi:10.3390/insects11050297.

Li, S.; Kong, L.; Yu, X. The expanding roles of endoplasmic reticulum stress in virus replication and pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology** 41(2): 150-164, 2013. doi:10.3109/1040841X.2013.813899.

Li, X.; Schuler, M.A.; Berenbaum, M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology** 52: 231-253, 2007. doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151104.

Linfield, D.T.; Raduka, A.; Aghapour, M.; Rezaee, F. Airway tight junctions as targets of viral infections: tight junctions and viral infections. **Tissue Barriers** 9(2): 1883965, 2021. doi: 10.1080/21688370.2021.1883965.

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** 89(22): 11203-11212, 2015.

Locali-Fabris, E.C.; Freitas-Astúa, J.; Souza, A.A.; Takita, M.A.; Astúa-Monge, G.; Antonioli-Luizon, R.; Rodrigues, V.; Targon, M.L.P.N.; Machado, M.A. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type. **Journal of General Virology** 87: 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, F.; Liang, X.; Lu, H.; Li, Q.; Chen, Q.; Zhang, P.; Li, K.; Liu, G.; Yan, W.; Song, J.; Duan, C.; Zhang, L. Overproduction of superoxide dismutase and catalase confer cassava resistance to *Tetranychus cinnabarinus*. **Scientific Reports** 7:40179, 2017. doi:10.1038/srep40179.

Lu, G.; Li, S.; Zhou, C.; Qian, X.; Xiang, Q.; Yang, T.; Wu, J.; Zhou, X.; Zhou, Y.; Ding, X.S.; Tao, X. Tenuivirus utilizes its glycoprotein as a helper component to overcome insect midgut barriers for its circulative and propagative transmission. **PLoS Pathogens** 15(3): e1007655, 2019. doi:10.1371/journal.ppat.1007655.

Lu, H.; Zhu, J.; Yu, J.; Chen, X.; Kang, L.; Cui, F. A symbiotic virus facilitates aphid adaptation to host plants by suppressing jasmonic acid responses. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 33(1): 55-65, 2020. doi:10.1094/MPMI-01-19-0016-R.

Lu, K.; Song, Y.; Zeng, R. The role of cytochrome P450-mediated detoxification in insect adaptation to xenobiotics. **Current Opinion in Insect Science** 43: 103-107, 2021. doi:10.1016/j.cois.2020.11.004.

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** 85(7): 3330-3340, 2011. doi:10.1128/JVI.02507-10.

Mascarenhas, G.; Kitajima, E.W.; Pereira, J.A.; Kubo, K.S.; Freitas-Astúa, J. *Passiflora edulis*: uma nova hospedeira para o vírus da mancha anular do cafeeiro (CoRSV). **Tropical and Plant Pathology** 34: s269, 2009.

Melzer, M.J.; Simbajon, N.; Carrilo, J.; Borth, W.B.; Freitas-Astúa, J.; Kitajima, E.W.; Neupane, K.R.; Hu, J.S. A cilevirus infects ornamental hibiscus in Hawaii. **Archives of Virology** 158: 2421-2424, 2013.

Mesa, N.C.; Ochoa, R.; Welbourn, W.C.; Evans, G.A.; Moraes, G.J.; A catalog of the

Tenuipalpidae (Acari) of the World with a key to genera. **Zootaxa** 2098: 1-185, 2009.

Michalak, M.; Corbett, E.F.; Mesaeli, N.; Nakamura, K.; Opas, M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. **Biochemical Journal** 344(2): 281-292, 1999.

Moreira, R.R.; Machado, F.J.; Lanza, F.E.; Trombin, V.G.; Bassanezi, R.B.; de Miranda, M.P.; Barbosa, J.C.; da Silva Jr., G.J.; Behlau, F. Impact of disease and pest on premature fruit drop in sweet orange orchards in São Paulo state citrus belt, Brazil. **Pest Management Science**, 2022. doi:10.1002/ps.6894.

Nascimento, R.S.; Souza, K.S.; Melo, E.A.S.F.; Tassi, A.D.; Castro, E.B.; Navia, D.; Mendonça, R.S.; Ochoa, R.; Oliveira, A.R. Flat mites (Tenuipalpidae) from Bahia state, Northeastern Brazil - a checklist including new records and an illustrated key to species. **Acarologia** 63(3): 619-636, 2023. doi:10.24349/b4op-onls.

Navia, D.; Mendonça, R.S.; Skoracka, A.; Szydło, W.; Knihinicki, D.; Hein, G.L.; Pereira, P.R.V.S.; Truol, G.; Lau, D. Wheat curl mite, *Aceria tosichella*, and transmitted viruses: an expanding pest complex affecting cereal crops. **Experimental and Applied Acarology** 59:95-143, 2012. doi:10.1007/s10493-012-9633-y.

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** 42(2): 406-426, 2013.

Navia, D.; Novelli, V.M.; Rombauts, S.; Freitas-Astúa, J.; Mendonça, R.S.; Nunes, M.A.; Machado, M.A.; Lin, Y-C.; Le, P.; Zhang, Z.; Grbic, M.; Wybouw, N.; Breeuwer, J.A.J.; Van Leeuwen, T.; Van de Peer, Y. Draft genome assembly of the false spider mite *Brevipalpus yothersi*. **Microbiology Resource Announcement** 8 (6): e01563-18, 2019. doi:10.1128/MRA.01563-18.

Neves, M.F.; Trombin, V.G. Anuário da Citricultura 2017. São Paulo: **CitrusBR**, 2017. 60p.

Neves, M.F.; Trombin, V.G.; Marques, V.N.; Martinez, L.F. Global orange juice market: a 16-year summary and opportunities for creating value. **Tropical Plant Pathology** 45:166–174, 2020. doi:10.1007/s40858-020-00378-1.

Niu, J.; Shen, G.; Christiaens, O.; Smagghe, G.; He, L.; Wang, J. Beyond insects: current status and achievements of RNA interference in mite pests and future perspectives. **Pest Management Science** 74(12): 2680-2687, 2018. doi:10.1002/ps.5071.

Noctor, G.; Mhamdi, A.; Foyer, C.H. Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. **Plant, Cell and Environment** 39: 1140-1160, 2016. doi:10.1111/pce.12726.

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 orchards in Brazil. **Plant Disease** 96(5): 770, 2012.

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** 102: 1046, 2018.

Nunes, M.A.; Ferreira, L.M.; Rogerio, L.A.; Kitajima, E.W.; Novelli, V.M. Infection by coffee ringspot virus is identified for the first time in succulent plants. **Journal of Plant Pathology** 104(2): 795-799, 2022. doi:10.1007/s42161-022-01100-7.

Olmedo-Velarde, A.; Roy, A.; Padmanabhan, C.; Nunziata, S.; Nakhla, M.K.; Melzer, M. First report of orchid fleck virus associated with citrus leprosis symptoms in rough lemon (*Citrus jambhiri*) and mandarin (*C. reticulata*) the United States. **Plant Disease** 105(8): 2258, 2021a. doi:10.1094/PDIS-12-20-2736-PDN.

Olmedo-Velarde, A.; Hu, J.; Melzer, M.J. A virus infecting *Hibiscus rosa-sinensis* represents an evolutionary link between cileviruses and Higreviruses. **Frontiers in Microbiology** 12: 988, 2021b. doi:10.3389/fmicb.2021.660237.

Olmedo-Velarde, A.; Roy, A.; Larrea-Sarmiento, A.; Wang, X.; Padmanabhan, C.; Nunziata, S.; Kakhla, M.K.; Hu, J.; Melzer, M. First report of the hibiscus strain of citrus leprosis virus C2 infecting passionfruit (*Passiflora edulis*). **Plant Disease**, 2022. doi: 10.1094/PDIS-10-21-2314-PDN.

Olmedo-Velarde, A.; Larrea-Sarmiento, A.; Wang, X.; Hu, J.; Melzer, M. A breakthrough in kitavirids: genetic variability, reverse-genetics, Koch's postulates and transmission of hibiscus green spot virus 2. **Phytopathology** 2023. doi:10.1094/PHYTO-04-23-0110-R.

Palmer, W.J.; Jiggins, F.M. Comparative genomics reveals the origins and diversity of arthropod immune systems. **Molecular Biology and Evolution** 32(8): 2111-2129, 2015. doi:10.1093/molbev/msv093.

Paskevicius, T.; Farraj, R.A.; Michalak, M.; Agellon, L.B. Calnexin, more than just a molecular chaperone. **Cells** 12(3): 403, 2023. doi:10.3390/cells12030403.

Pfaffl, M.W.; Tichopad, A.; Prgomet, C.; Neuvians, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters** 26(6): 509-515, 2004.

Prasad, V.; Greber, U.F. The endoplasmic reticulum unfolded protein response - homeostasis, cell death and evolution in virus infections. **FEMS Microbiology Reviews** 45: 1-19, 2021. doi:10.1093/femsre/fuab016.

Quito-Avila, D.F.; Freitas-Astúa, J.; Melzer, M.J. Bluner-, Cile-, and Higreviruses (*Kitaviridae*). **Reference Module in Life Sciences**, 1-5, 2020. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.21248-X.

Ramalho, T.O.; Figueira, A.R.; Sotero, A.J.; Wang, R.; Geraldino Duarte, P.S.; Farman, M.; Goodin, M.M. Characterization of coffee ringspot virus-Lavras: a model for an emerging threat to coffee production and quality. **Virology**, 464-465: 385-396, 2014. doi:10.1016/j.virol.2014.07.031

Ramalho, T.O.; Figueira, A.R.; Wang, R.; Jones, O.; Harris, L.E.; Goodin, M.M. Detection and survey of coffee ringspot virus in Brazil. **Archives of Virology** 161: 335-343, 2015. doi:10.1007/s00705-015-2663-0.

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** 8(153): v8060153, 2016.

Ramos-González, P.L.; Chabi-Jesus, C.; Guerra-Peraza, O.; Tassi, A.D.; Kitajima, E.W.; Harakava, R.; Salaroli, R.B.; Freitas-Astúa, J. Citrus leprosis virus N: a new dichorhavirus citrus leprosis disease. **Phytopathology** 107(8): 963-976, 2017.

Ramos-González, P.L.; Chabi-Jesus, C.; Banguela-Castillo, A.; Tassi, A.D.; Rodrigues, M.C.; Kitajima, E.W.; Harakava, R.; Freitas-Astúa, J. Unveiling the complete genome sequence of Clerodendrum chlorotic spot virus, a putative dichorhavirus infecting ornamental plants. **Archives of Virology** 163(9): 2519-2524, 2018a.

Ramos-González, P.L.; Chabi-Jesus, C.; Arena, G.D.; Tassi, A.D.; Kitajima, E.W.; Freitas-Astúa, J. Citrus leprosis: a unique multietiological disease/Leprosis de los cítricos: una enfermedad multietiológica singular. **Citrus in the Americas** 1: 4-19, 2018b.

Ramos-González, P.L.; dos Santos, G.F.; Chabi-Jesus, C.; Harakava, R.; Kitajima, E.W.; Freitas-Astúa, J. Passion fruit green spot virus genome harbors a new orphan ORF and highlights the flexibility of the 5'-end of the RNA2 segment across cileviruses. **Frontiers in Microbiology** 11: 206, 2020. doi:10.3389/fmicb.2020.00206.

Ramos-González, P.L.; Chabi-Jesus, C.; Tassi, A.D.; Calegario, R.F.; Harakava, R.; Nome, C.F.; Kitajima, E.W.; Freitas-Astúa, J. A novel lineage of Cile-like viruses discloses the phylogenetic continuum across the family *Kitaviridae*. **Frontiers in Microbiology** 13: 836076, 2022. doi:10.3389/fmicb.2022.836076.

Ramos-González, P.L.; Arena, G.D.; Tassi, A.D.; Chabi-Jesus, C.; Kitajima, E.W.; Freitas-Astúa, J. Kitaviruses: a window to atypical plant viruses causing nonsystemic diseases. **Annual Review of Phytopathology** 61:8.1-8.22, 2023. doi:10.1146/annurev-phyto-021622-121351.

Rhodes, V..L.M.; Michel, K. Modulation of mosquito immune defenses as a control strategy. In: **Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission**, v. 1. Academic Press, 2017. p. 59-89.

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** 28(1): 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** 59: 165-175, 2013.

Rodrigues, J.C.V.; Rodriguez, C.M.; Moreira, L.; Villalobos, W.; Rivera, C.; Childers, C.C. Occurrence of coffee ringspot virus, a *Brevipalpus* miteborne virus in coffee in Costa Rica.

**Plant Disease** 86(5): 564, 2002. doi:10.1094/PDIS.2002.86.5.564B.

Rodrigues, M.C. **Caracterização de um novo agente causal associado a manchas cloróticas em citros**. 2022. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Instituto Biológico, São Paulo, 2022.

Rogério, L.A.; Galdeano, D.M.; Arena, G.D.; Nunes, M.A.; Machado, M.A.; Novelli, V.M. Reference genes for gene expression studies by RT-qPCR in *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae), the mite vector of citrus leprosis virus. **Scientific Reports** 9: 6536, 2019. doi:10.1038/s41598-019-42993-2.

Rosche, K.L.; Sidak-Loftis, L.C.; Hurtado, J.; Fisk, E.A.; Shaw, D.K. Arthropods under pressure: stress responses and immunity at the pathogen-vector interface. **Frontiers in Immunology** 11: 629777, 2021. doi:10.3389/fimmu.2020.629777.

Rosen, R. et al. Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vector. **Current Opinion in Virology** 15: 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** 103(5): 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** 1(4): e00519-13, 2013b.

Roy, A.; León, 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** 98(8): 1162, 2014. doi:10.1094/PDIS-02-14-0117-PDN.

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** 105(7): 1013-1025, 2015a.

Roy, A.; Stone, A.L.; Shao, J.; Otero-Colina, G.; Wei, G.; Choudhary, N.; Achor, D.; Levy, L.; Nakhla, M.K.; Hartung, J.S.; Schneider, W.L.; Brlansky, R.H. Identification and molecular characterization of nuclear citrus leprosis virus, a member of the proposed Dichorhavirus genus infecting multiple citrus species in Mexico. **Phytopathology** 105(4): 564-575, 2015b.

Roy, A.; Stone, A.L.; Melzer, M.J.; Shao, J.; Hartung, J.S.; Mavrodieva, V.; Nakhla, M.K.; Brlansky, R.H.; Schneider, W.L. Complete nucleotide sequence of a novel hibiscus-infecting Cilevirus from Florida and its relationship with closely associated cileviruses. **Genome Announcements** 6(4): e01521-17, 2018. doi:10.1128/genomeA.01521-17.

Roy, A.; Leon, G.M.; Nunziata, S.; Padmanabhan, C.; Rivera, Y.; Brlansky, R.H.; Hartung, J.S. First report of passion fruit green spot virus in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) in Casanra, Colombia. **Plant Disease** 107(7): 2270, 2023. doi:10.1094/PDIS-09-

22-2267-PDN.

Salinas-Vargas, D.; Santillán-Galicia, M.T.; Guzmán-Franco, A.W.; Mora-Aguilera, G.; Ortega-Arenas, L.D.; Hernández-López, A.; Sánchez-Soto, S. Development and reproduction of *Brevipalpus yothersi* on orange fruits infected with citrus leprosis virus C. **International Journal of Acarology** 45(4): 209-213, 2019. doi:10.1080/01647954.2019.1586993.

Sánchez-Velázquez, 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* populations from Brazil and Mexico. **PLOS One** 10(7): 1-16, 2015.

Santamaria, M.E.; González-Cabrera, J.; Martínez, M.; Grbic, V.; Castañera, P.; Díaz, I.; Ortego, F. Digestive proteases in bodies and faeces of the tow-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. **Journal of Insect Physiology** 78: 69-77, 2015. doi:10.1016/j.jinsphys.2015.05.002.

Santos-Matos, G.; Wybouw, N.; Martins, N.E.; Zéle, F.; Riga, M.; Leitão, A.B.; Vontas, J.; Grbic, M.; van Leeuwen, T.; Magalhães, S.; Sucena, E. *Tetranychus urticae* mites do not mount an induced immune response against bacteria. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 284(1856): 20170401, 2017. doi:10.1098/rspb.2017.0401.

Sarkar, P.; Ghanim, M. Interaction of *Liberibacter solanacearum* with host psyllid vitellogenin and its association with autophagy. **Microbiology Spectrum** 10(4): e01577-22, 2022. doi:10.1128/spectrum.01577-22.

Sidak-Loftis, L.C.; Rosche, K.L.; Pence, N.; Ujczko, J.K.; Hurtado, J.; Fisk, E.A.; Goodman, A.G.; Noh, S.M.; Peters, J.W.; Shaw, D.K. The unfolded-protein response triggers the arthropod immune deficiency pathway. **mBio** 13(4): e00703, 2022. doi:10.1128/mbio.00703-22.

Silver, N.; Best, S.; Jiang, J.; Thein, S.L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology** 7: 1-9, 2006. doi:10.1186/1471-2199-7-33.

Sinico, T.E. **Avaliação da interação entre ácaros *Brevipalpus yothersi* Baker (1949) e o vírus da leprose dos citros C (CiLV-C)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018. doi:10.11606/D.11.2018.tde-01082018-183208.

Sterck, L.; Billiau, K.; Abeel, T.; Rouzé, P.; Van de Peer, Y. ORCAE: online resource for Community annotation of eukaryotes. **Nature Methods** 9(11): 1041, 2012.

Swift, M.L. GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences** 37(2): 411-412, 1997.

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** 71: 227-241, 2017.

Tassi, A.D.; Ramos-González, P.L.; Kitajima, E.W.; Freitas-Astúa, J. Clerodendrum chlorotic

spot virus and *Brevipalpus yothersi* mite: a model for the study of the dichorhavirus-vector interaction. In: **Congresso Brasileiro de Virologia**, 31, 2020.

Tassi, A.D.; Ramos-González, P.L.; Sinico, T.E.; Kitajima, E.W.; Freitas-Astúa, J. Circulative transmission of cileviruses in *Brevipalpus* mites may involve the paracellular movement of virions. **Frontiers in Microbiology** 13:836743, 2022. doi:10.3389/fmicb.2022.836743.

USDA – United States Department of Agriculture. **Citrus: World markets and trade**. 2022. Disponível em: < <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf> >.

Vandesompele, J.; de Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Roy, N.V.; de Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology** 3(7): 1-12, 2002. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034.

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** 6: e26591, 2017. doi:10.7554/eLife.26591.

Wang, Y-M.; He, Y-Z.; Ye, X-T.; Guo, T.; Pan, L-L.; Liu, S-S.; Ng, J.C.K.; Wang, X-W. A balance between vector survival and virus transmission is achieved through JAK/STAT signaling inhibition by a plant virus. **PNAS** 119(41): e2122099119, 2022. doi:10.1073/pnas.2122099119.

Watts, J.L.; Browse, J. Dietary manipulation implicates lipid signaling in the regulation of germ cell maintenance in *C. elegans*. **Developmental Biology** 292(2): 381-392, 2006. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.01.013.

Weeks, A.; Marec, F.; Breeuwer, J.A.J. A mite species that consists entirely of haploid females. **Science** 292: 2479-2482, 2001.

Wei, J.; He, Y-Z.; Guo, Q.; Guo, T.; Liu, Y-Q.; Zhou, X-P.; Liu, S-S.; Wang, X-W. Vector development and vitellogenin determine the transovarial transmission of begomoviruses. **PNAS** 114(26): 6746-6751, 2017. doi:10.1073/pnas.1701720114.

Whitfield, A.E.; Falk, B.W.; Rotenberg, D. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. **Virology** 479-480: 278-289, 2015. doi:10.1016/j.virol.2015.03.026.

Whitfield, A.E.; Huot, O.B.; Martin, K.M.; Kondo, H.; Dietzgen, R.G. Plant rhabdoviruses—their origins and vector interaction. **Current Opinion in Virology** 33: 198-207, 2018. doi: 10.1016/j.coviro.2018.11.002.

Widana-Gamage, S.M.K.; Rotenberg, D.; Schneweis, D.J.; Tsai, C-W.; Dietzgen, R.G. Transcriptome-wide responses of adult melon thrips (*Thrips palmi*) associated with capsicum chlorosis virus infection. **PLOS One** 13(12): e0208538, 2018. doi:10.1371/journal.pone.0208538.

Wu, K.; Hoy, M.A. The glutathion-S-transferase, cytochrome P450 and carboxyl/cholinesterase gene superfamilies in predatory mite *Metaseiulus occidentalis*. **PLOS One** 11(7): e0160009, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0160009.

Xie, F.; Xiao, P.; Chen, D.; Xu, L.; Zhang, B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology** 80: 75-84, 2012.

Yoshikawa, Y.; Sugimoto, K.; Ochiai, Y.; Ohashi, N. Intracellular proliferation of *Anaplasma phagocytophilum* is promoted via modulation of endoplasmic reticulum stress signaling in host cells. **Microbiology and Immunology** 64(4): 270-279, 2020. doi:10.1111/1348-0421.12770.

Zélé, F.; Santos-Matos, G.; Figueiredo, A.R.T.; Eira, C.; Pinto, C.; Laurentino, T.G.; Sucena, E.; Magalhães, S. Spider mites escape bacterial infection by avoiding contaminated food. **Oecologia** 189: 111-122, 2019. doi:10.1007/s00442-018-4316-y.

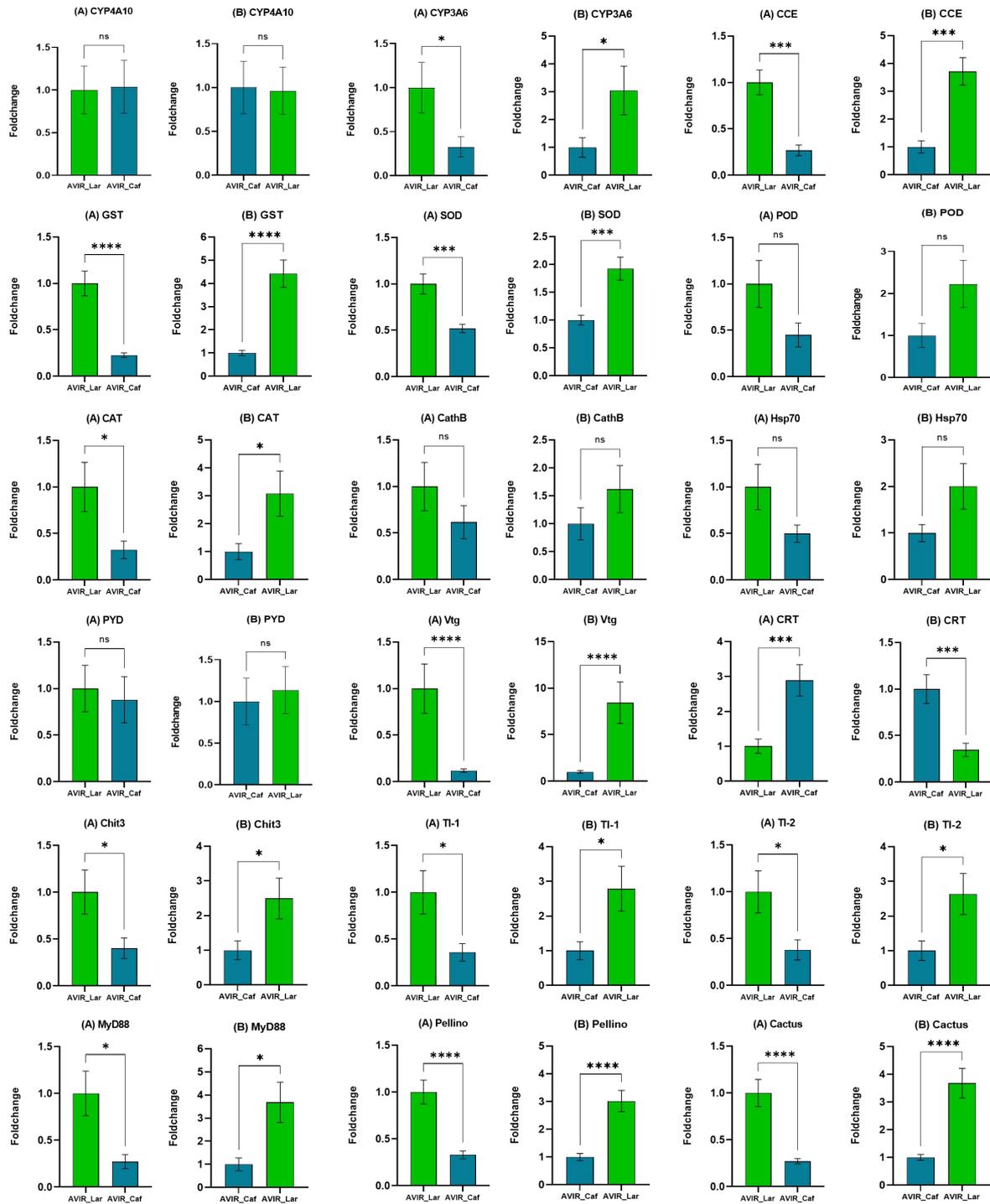
Zhang, B-Z.; Su, X.; Xie, L-F.; Zhen, C-A.; Hu, G-L.; Jiang, K.; Huang, Z.Y.; Liu, R-Q.; Gao, Y-F.; Chen, X-L.; Gao, X-W. Multiple detoxification genes confer imidacloprid resistance to *Sitobion avenae* Fabricius. **Crop Protection** 128: 105014, 2020. doi:10.1016/j.cropro.2019.105014.

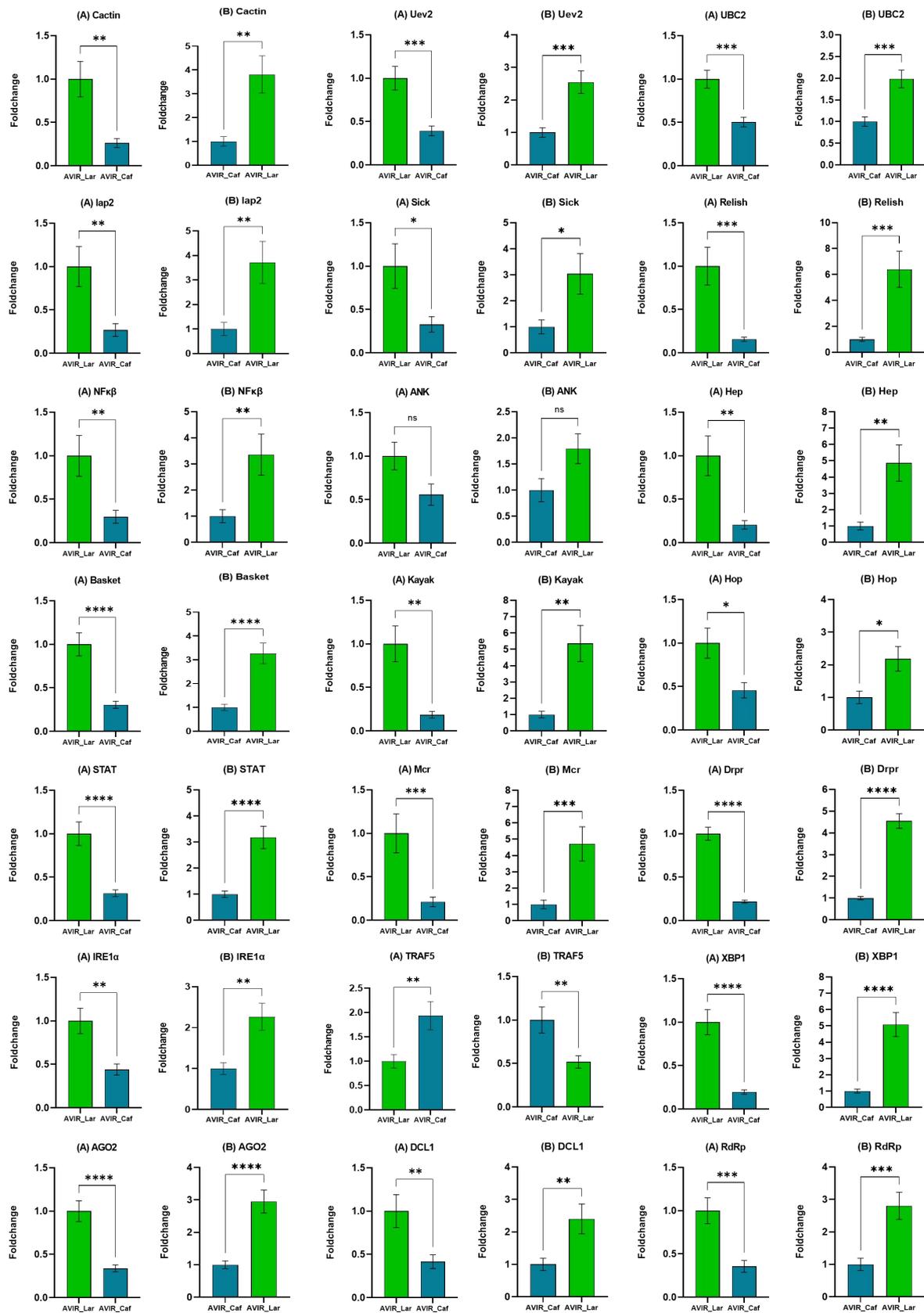
Zhao, S.; Fernald, R.D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology**, New York 12(8): 1045-1062, 2005.

Zhao, L.; Jones, W.A. Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. **Invertebrate Survival Journal** 9(1): 93-101, 2012.

Zhurov, V.; Navarro, M.; Bruinsma, K.A.; Arbona, V.; Santamaria, M.E.; et al. Reciprocal responses in the interaction between arabdopsis and the cell-content-feeding chelicerate herbivore spider mite. **Plant Physiology** 164: 384-399, 2014.

## ANEXO A - Expressão gênica de ácaros *B. yothersi* avirulíferos nas diferentes hospedeiras vegetais





**Figura 30** - Perfil de expressão gênica diferencial de ácaros *B. yothersi* avirulíferos (AVIR) mantidos em diferentes hospedeiras vegetais: frutos de laranja doce sadios (AVIR\_Lar), representados pelas barras verdes; folhas sadias de caféiro (AVIR\_Caf), representados pelas barras azuis. Os valores de *foldchange* representam a média de 20 réplicas biológicas para cada tratamento. (A) as análises de expressão foram realizadas utilizando o tratamento AVIR\_Lar como controle; (B) as análises de expressão foram realizadas utilizando o tratamento

AVIR\_Caf como controle. Barras de erros representam o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), não significativo (ns).