

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

SÂMARA VIEIRA ROCHA

**ESTUDOS DO USO DE CISTATINAS VISANDO A RESISTÊNCIA À *Diaphorina citri*,
INSETO VETOR DA DOENÇA HUANGLONGBING (HLB), VIA CTV (VÍRUS DA
TRISTEZA DOS CITROS) NA PLANTA, E ENSAIOS DE INTERAÇÃO PATÓGENO-
VETOR COM ÊNFASE NAS CATEPSINAS B E L-LIKE**

Orientação: Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes

São Carlos

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

SÂMARA VIEIRA ROCHA

**ESTUDOS DO USO DE CISTATINAS VISANDO A RESISTÊNCIA À *Diaphorina citri*,
INSETO VETOR DA DOENÇA HUANGLONGBING (HLB), VIA CTV (VÍRUS DA
TRISTEZA DOS CITROS) NA PLANTA, E ENSAIOS DE INTERAÇÃO PATÓGENO-
VETOR COM ÊNFASE NAS CATEPSINAS B E L-LIKE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências (Ciências Biológicas).

Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

São Carlos

2024

Rocha, Sâmara Vieira

Estudos do uso de cistatinas visando a resistência à Diaphorina citri, inseto vetor da doença Huanglongbing (HLB), via CTV (Vírus da Tristeza dos Citros) na planta, e ensaios de interação patógeno-vetor com ênfase nas catepsinas B e L-like / Sâmara Vieira Rocha -- 2024. 162f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Andrea Soares da Costa Fuentes

Banca Examinadora: Andrea Soares da Costa Fuentes, Anderson Ferreira da Cunha, Wilson Malagó Júnior, Maria Célia Bertolini, Nelson Arno Wulff

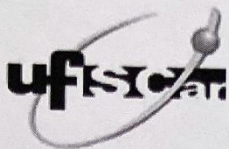
Bibliografia

1. Huanglongbing. 2. Catepsinas. 3. Cistatinas. I. Rocha, Sâmara Vieira. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Relatório de Defesa de Tese Candidata: Sâmara Vieira Rocha

Aos 15/03/2024, às 14:00, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, a defesa de tese de doutorado sob o título: ESTUDOS DO USO DE CISTATINAS VISANDO A RESISTÊNCIA À Diaphorina citri, INSETO VETOR DA DOENÇA HUANGLONGBING (HLB), VIA CTV (VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITROS) NA PLANTA, E ENSAIOS DE INTERAÇÃO PATÓGENO- VETOR COM ÊNFASE NAS CATEPSINAS B E L-LIKE, apresentada pela candidata Sâmara Vieira Rocha. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca

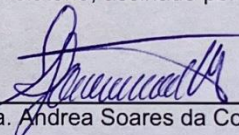
Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes
Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha
Prof. Dr. Wilson Malagó Júnior
Profa. Dra. Maria Célia Bertolini
Prof. Dr. Nelson Arno Wulff

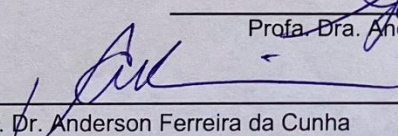
Função	Instituição	Conceito
Presidente	UFSCar	<u>A</u>
Titular	UFSCar	<u>A</u>
Titular	EMBRAPA	<u>A</u>
Titular	UNESP	<u>A</u>
Titular	FUNDECITRUS	<u>A</u>

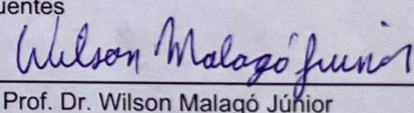
Resultado Final: APROVADA

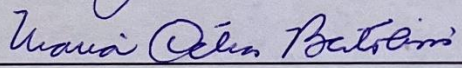
Parecer da Comissão Julgadora*:

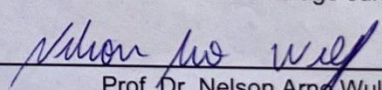
Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, Ivanildes Menezes, representante do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.


Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes


Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha


Prof. Dr. Wilson Malagó Júnior


Profa. Dra. Maria Célia Bertolini


Prof. Dr. Nelson Arno Wulff

Representante do PPG: Ivanildes Menezes

(x) Não houve alteração no título () Houve alteração no título. O novo título passa a ser:

Observações:

- Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.
- Para gozar dos direitos do título de Mestre ou Doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, o candidato ainda precisa ter sua dissertação ou tese homologada pelo Conselho de Pós-Graduação da UFSCar.

Dados curriculares

Nome: Sâmara Vieira Rocha

Nome em citações bibliográficas: Rocha, S. V.; Rocha, Sâmara Vieira.

Endereço profissional:

Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução (DGE), Laboratório de Biotecnologia Vegetal. Rodovia Washington Luís, Km 235, São Carlos -SP, CEP: 13.565-905.

Formação acadêmica:

Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado)

Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos – SP, Brasil.

Período: 2013-2017

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP.

Artigos completos publicados em periódicos:

1. Schneider, Vanessa Karine; Da Silva Ferrara, Taíse Fernanda; Rocha, Sâmara Vieira; Santos-Júnior, Célio Dias; Neo-Justino, Daniela Morilha; Da Cunha, Anderson Ferreira; De Oliveira Da Silva, João Pedro Maia; Dos Santos Tersariol, Ivarne Luis; Carmona, Adriana Karaoglanovic; Henrique-Silva, F.; Soares-Costa, A. Recombinant expression, characterization and phylogenetic studies of novels cystatins-like proteins of sweet orange (*Citrus sinensis*) and clementine (*Citrus clementina*). International journal of biological macromolecules, v. 152, p. 546-553, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.280>
2. Da Ponte Leguizamón N, De Molon Rs, Coletto-Nunes G, A.V.B. Nogueira, S.V. Rocha, D.M. Neo-Justino, A. Soares-Costa, P.S. Cerri, U.H. Lerner, P.P.C. Souza, J.A. Cirelli.

Phytocystatin CsinCPI-2 Reduces Osteoclastogenesis and Alveolar Bone Loss. *Journal of Dental Research*. July 2021. DOI: <https://doi.org/10.1177/00220345211027811>

3. Oliveira MdS, Rocha SV, Schneider VK, Henrique-Silva F, Soares MR, Soares-Costa A. 2021. Physiological, nutritional, and molecular responses of Brazilian sugarcane cultivars under stress by aluminum. *PeerJ* 9:e11461. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.11461>

4. Olinda S. A. Alcobaça, Emeline B. Campanini, Iara Ciancaglini, Sâmara V. R. Rocha, Iran Malavazi, Caio C. M. Freire, Francis M. F. Nunes, Andrea S. C. Fuentes and Anderson F. Cunha. Identification of a New Endo- β -1,4-Xylanase Prospected from the Microbiota of the Termite *Heterotermes tenuis*. *Microorganisms*, v. 10 (5), p. 906, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050906>

5. Ibanez, F.; Rocha, S. V.; Dawson, W. O.; El-Mohtar, C.; Robertson, C.; Stelinski, L. L.; Soares-Costa, A. Gene silencing of cathepsins B and L using CTV-based, plant-mediated RNAi interferes with ovarial development in Asian citrus psyllid (ACP), *Diaphorina citri*. *Frontiers in Plant Science*, 14 :1219319, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1219319>

Trabalhos apresentados em congressos:

Rocha, S. V.; Levy, A.; Soares-Costa, A. Citrus cystatins: Plant defense proteins. In: 11th Annual UF/IFAS CREC Research Symposium, 2023. Lake Alfred, FL, USA.

Rocha, S. V.; Levy, A.; Soares-Costa, A. Citrus cystatins: Plant defense proteins. In: Florida Phytopathological Society (FPS): 18th Biennial meeting em Immokalee, 2023. Immokalee, FL, USA.

Participação em eventos e congressos:

1. I Workshop do Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, 2018. São Carlos, SP, Brasil.

2. III Curso de Inverno em Biotecnologia, 2019. Departamento de Genética e Evolução, São Carlos, SP, Brasil.

3. I Workshop de Biotecnologia Vegetal UFSCar/Esalq-USP, 2019. Departamento de Genética e Evolução, São Carlos, SP, Brasil.

4. 11th Annual UF/IFAS CREC Research Symposium, 2023. Lake Alfred, FL, USA.

5 Florida Phytopathological Society (FPS): 18th Biennial meeting em Immokalee, 2023. Immokalee, FL, USA.

Formação Complementar:

Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) - *A study of plant bacteria vector network interactions of HLB Citrus disease through an Immuno Ultrastructural and Subcellular Localization Technologies. Citrus Research and Education Center (CREC), University of Florida. Lake Alfred, FL, USA.*

Supervisão: Dr. Amit Levy

Outras participações:

1. Participação como revisora na revista *Plant Physiology and Biochemistry*.

2. Participação como avaliadora na fase I do Projeto Centelha do Estado de São Paulo (equipe executora: FAPESP).

3. Participação no 20º Ciclo do Treinamento PIPE Empreendedor FAPESP.

3. Participação do projeto PIPE FAPESP intitulado “produção recombinante de uma Miraculina de citrus em sistema de expressão *Pichia pastoris* para desenvolvimento de adoçantes industriais (2021-2022).

A Deus por tudo o que É, fez e faz por mim,

Com imenso amor e graça,

OFEREÇO

*Ao meu esposo Lucas, meus pais Silvio e Silvania,
Minha irmã Quedma, Robson, a toda a minha família
por todo o suporte e amor,*

DEDICO

“Pois dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas.

A Ele seja a glória para sempre! Amém.”

Romanos 11:36

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conduzir ao longo dessa caminhada. Agradeço por se fazer presente em minha vida de forma tão real, me capacitando, me conduzindo e me auxiliando todos os dias. Sei que não conseguiria chegar aqui se não tivesse o Senhor ao meu lado.

Agradeço aos meus pais, Silvio e Silvania, por sempre me apoiarem e sonharem esse sonho comigo, por orarem por mim; com certeza vocês são partes fundamentais dessa conquista. Deus me presenteou como vocês. Amo muito vocês e quero que saibam que são minha inspiração!

Meu muito obrigada ao meu esposo Lucas, que trilhou esse caminho estando comigo lado a lado, nos dias bons e ruins, sendo parceiro, amigo, me apoiando e sonhando meus sonhos! Te amo e sou realmente grata por ter você ao meu lado. Não conseguiria sem você!

Agradeço a minha irmã, Quedma, meu cunhado Robson por sempre me apoiarem e tornarem essa caminhada mais leve, cheio de risos e momentos muito felizes! Amo vocês!

Professora Dra. Andrea, muito obrigada! Sou grata a Deus por Ele ter me permitido te conhecer e, mais grata ainda, porque você me aceitou como aluna, tenho certeza de que isso fez e faz parte dos propósitos d'Ele. Obrigada pela orientação tão presente, por todos os ensinamentos e por ser uma amiga! Você é especial e me inspira como pessoa e como profissional. Seus ensinamentos foram valiosos na minha caminhada!

Agradeço as minhas amigas Daniela, Karina, Isabela e Olinda. Vocês com certeza tornaram os meus dias melhores e essa jornada mais suave! Sou grata pela amizade, pelos ensinamentos, pelas experiências compartilhadas, por toda a parceria! Vocês foram e são fundamentais para mim! Meu muito obrigada ao Edésio e Oli, por serem amigos especiais e me ajudarem de forma tão altruísta sempre.

Aos meus sogros, Rute e Paulo, cunhados Bruna, Débora, Gláucio, sobrinhos, meus avós, Nério e Narcisa, a todos da minha família: obrigada! Sei que sempre me suportaram e oraram por mim! Amo vocês.

Ao programa de pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da UFSCar. Bem como a Universidade Federal de São Carlos, que me ensinou tanto sobre ciência, sobre a vida e muito mais! À CAPES por financiar inicialmente minha inserção na pós-graduação, pois entrei no mestrado e, posteriormente, passei para o doutorado direto devido a tal suporte.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de estudo de doutorado (FAPESP – processo 2018/20823-5) e pelo financiamento do projeto BEPE (FAPESP- processo 2021/13093-3).

A equipe do Fundecitrus, especialmente prof. Dr. Nelson, Elaine, Sidnei, Rosângela, Afrânio, Fabrício, por tanto me ensinarem e colaborarem com o desenvolvimento desde projeto. A equipe do prof. Marcelo, Rafael e Wellington, por toda a colaboração no ensaio biológico. Ao time Fundecitrus, vocês abriram as portas e me fizeram sentir em casa! Agradeço muito por todo o suporte. Michele, Heloísa, Beatriz, Josy, muito obrigada por compartilhar conversas, almoços, experiências e protocolos! Realmente foi muito bom ter vocês ao meu lado!

Ao prof. Dr. Amit por ter me recebido em seu laboratório durante meu estágio de doutorado na *University of Florida*, por todo o apoio e ensinamento. Além disso, agradeço por tão prontamente me fazer sentir parte da equipe.

A todos do time *Plant Pathology* do *Citrus Research and Education Center (University of Florida)*, obrigada!

Ao prof. Dr. Flávio que sempre gentilmente disponibilizou o Laboratório de Biologia Molecular para a realização de diversos experimentos, obrigada!

Não fazemos nada sozinhos. Assim, com carinho reforço meu agradecimento a minha família, amigos, professores, colegas, que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse aqui. Certamente, todos foram fundamentais para mais essa etapa.

Gratidão!

RESUMO

A citricultura brasileira é uma das mais importantes atividades agrícolas para a economia nacional, sendo o Brasil, a nível mundial, o principal produtor de laranja e o maior exportador de suco concentrado e congelado da fruta. Os pomares de citros, no entanto, vêm sofrendo constantemente com diversos problemas fitossanitários, com destaque para o Huanglongbing (HLB) que vem causando sérios prejuízos à citricultura, já que as plantas contaminadas apresentam menor tamanho dos frutos, maior grau de acidez e menor porcentagem de suco. A doença é associada principalmente a presença da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) que coloniza os vasos do floema e é transmitida às plantas de citros pelo psilídeo *Diaphorina citri*. Na ausência de estratégias de controle da bactéria CLAs, a ênfase tem sido no controle de *D. citri*. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo o emprego do vetor baseado no vírus *Citrus Tristeza Virus* (CTV) para a superexpressão das cistatinas CclemCPI-1 e CsinCPI-2, visando a inibição de peptidases-alvo no psilídeo *D. citri*. Além disso, estudos foram realizados para a compreensão da localização e expressão gênica e proteica das enzimas do tipo cisteíno peptidases de *D. citri*, na presença ou ausência da bactéria CLAs. Bioensaios de alimentação foram realizados com os psilídeos utilizando dieta artificial contendo as cistatinas de citros recombinantes e, foram testados em três fases do desenvolvimento de *D. citri*: ovo, ninfa e adultos, com intuito de investigar o resultado das interações proteicas (cistatinas-peptidases) nos diferentes estágios de desenvolvimento, bem como na presença ou ausência da bactéria associada ao HLB. Quanto aos resultados obtidos, nas plantas de citros infectadas com o vetor CTV, foi verificada a infecção sistêmica e confirmada a presença da construção CTV-cistatinas. Nos ensaios biológicos realizados com as plantas CTV-cistatinas, insetos de *D. citri* foram confinados, porém as plantas superexpressando as cistatinas não se mostraram efetivas em reduzir a viabilidade/quantidade de ovos e ninfas de *D. citri*, o que requer maiores investigações e a repetição do ensaio adotado neste trabalho. Contudo, a importância das peptidases-alvo do psilídeo foi confirmada, especialmente na presença da bactéria CLAs, o que indica sua participação em respostas de defesa do inseto. No entanto, supostamente, a presença da bactéria se mostra como um fator limitante para a eficácia das cistatinas, onde as populações livres da bactéria apresentam maior redução populacional frente ao efeito da proteína inibidora, quando comparada aos insetos contaminados pela bactéria. Quanto as fases de desenvolvimento avaliadas, as ninfas se mostraram mais suscetíveis a inibição mediada pela cistatina, sendo esse estágio mais efetivo para o controle do inseto ao utilizar as proteínas recombinantes em comparação com a fase adulta. Um ensaio realizado durante a eclosão de ovos de *D. citri* em meio artificial contendo a cistatina CsinCPI-2 se mostrou promissor, visto que a cistatina presente na dieta artificial, supostamente, foi capaz de interferir no surgimento de ninfas de primeiro ínstar ao reduzir em 53,8% a eclosão dos ovos deste inseto. Esses resultados requerem maiores investigações, não obstante, o uso das cistatinas visando o controle de *D. citri* ainda se mostra altamente promissor e espera-se que em um futuro próximo possa efetivamente fazer parte do estabelecimento de culturas de citros resistentes ao vetor do HLB, como estratégia de manejo eficaz, porém sustentável.

Palavras-chave: *Citrus*, HLB, CLAs, *Diaphorina citri*, superexpressão proteica, CTV, cistatinas, CclemCPI-1, CsinCPI-2, peptidases, DcCathB, DcCathL.

ABSTRACT

Brazilian citrus farming is one of the most important agricultural activities for the national economy, with Brazil being the world's leading producer of oranges and the largest exporter of concentrated and frozen citrus juice. Citrus groves, however, are constantly suffering from various phytosanitary problems, especially Huanglongbing (HLB), which has caused serious damage to citrus farming, since contaminated plants have smaller fruit, a higher degree of acidity and a lower percentage of juice. The disease is mainly associated with the presence of the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), which colonizes the phloem vessels and is transmitted to citrus plants by the psyllid *Diaphorina citri*. In the absence of strategies to control the CLAs bacterium, the emphasis has been on controlling *D. citri*. Therefore, the aim of this study was to use a vector based on the Citrus Tristeza Virus (CTV) to overexpress the cystatins CclemCPI-1 and CsinCPI-2, in order to inhibit target peptidases in the *D. citri* psyllid. In addition, studies were carried out to understand the localization and gene and protein expression of *D. citri* cysteine peptidases in the presence or absence of CLAs bacteria. Feeding bioassays were carried out with the psyllids using an artificial diet containing the recombinant citrus cystatins and were tested at three stages of *D. citri* development: egg, nymph and adult, in order to investigate the result of protein interactions (cystatins-peptidases) at different stages of development, as well as in the presence or absence of the bacterium associated with HLB. As for the results obtained, in citrus plants infected with the CTV vector, systemic infection was verified and the presence of the CTV-cystatins construct was confirmed. In the biological tests carried out with the CTV-cystatin plants, *D. citri* insects were confined, but the plants overexpressing the cystatins were not effective in reducing the viability/quantity of *D. citri* eggs and nymphs, which requires further investigation and repetition of the test adopted in this work. However, the importance of the psyllid's target peptidases was confirmed, especially in the presence of the CLAs bacterium, which indicates their participation in the insect's defense responses. However, the presence of the bacterium is supposed to be a limiting factor for the efficacy of the cystatins, where populations free of the bacterium show a greater population reduction in relation to the effect of the inhibiting protein, when compared to insects contaminated by the bacterium. As for the developmental stages evaluated, the nymphs proved to be more susceptible to cystatin-mediated inhibition, with this stage being more effective for controlling the insect when using the recombinant proteins compared to the adult stage. A test carried out during the hatching of *D. citri* eggs in artificial medium containing the cystatin CsinCPI-2 proved promising, since the cystatin present in the artificial diet was supposedly able to interfere with the emergence of first-stage nymphs by reducing the hatching of the insect's eggs by 53.8%. These results require further investigation. Nevertheless, the use of cystatins to control *D. citri* is still highly promising and it is hoped that in the near future they will effectively form part of the establishment of citrus crops resistant to the HLB vector, as an effective but sustainable management strategy.

Keywords: *Citrus*, HLB, CLAs, *Diaphorina citri*, transient expression, CTV, cystatins, CclemCPI-1, CsinCPI-2, peptidases, DcCathB, DcCathL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa com destaque em laranja para os países produtores de citros ao longo do mundo.....	28
Figura 2 - Principais sintomas do HLB em citros.....	30
Figura 3 - Colonização do floema vegetal por <i>Candidatus Liberibacter spp.</i>	31
Figura 4 - Ciclo de vida do inseto <i>D. citri</i>	32
Figura 5 - <i>D. citri</i> nos estágios de ninfa e adultos e seu comportamento alimentar.....	33
Figura 6 - Esquema representativo da atividade proteolítica de uma cisteíno-peptidase contra um substrato genérico.....	35
Figura 7 - Representação da interação entre cistatina e uma cisteíno-peptidase.....	37
Figura 8 - Vírus da Tristeza do Citrus (CTV).....	39
Figura 9 - Representação esquemática do genoma do Citrus tristeza vírus (CTV).....	40
Figura 10 - Principais sintomas associados à doença da Tristeza do citros causadas pelo CTV.....	41
Figura 11 - Representação esquemática da estratégia de manejo de <i>D. citri</i> com utilização do vetor viral CTV para a entrega da cistatina em citros.....	44
Figura 12 - Representação esquemática da estratégia de clonagem em plasmídeo (pCAMBIA-1380) contendo o vetor CTV.....	49
Figura 13 - Foto do processo de agroinfiltração da suspensão celular de <i>A. tumefaciens</i> transformadas com as construções CTV316-4_CSinCPI-2, CTV33-23_GFP, CTV316-4_CclemCPI-1 e o vetor CTV_316-4, em <i>N. benthamiana</i>	52
Figura 14 - - Folhas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas com suspensões celulares de <i>A. tumefaciens</i> contendo construções de interesse (CTV316-4_CSinCPI-2, CTV316-4_CclemCPI-1 e CTV316-4), foram utilizadas no processo de purificação dos vírions de CTV.	54

Figura 15 - Inoculação mecânica (<i>Bark-flap</i>) da solução de vírions em <i>C. macrophylla</i>	55
Figura 16 - Propagação do CTV recombinante em limão cravo através da transferência de borbulhas.....	56
Figura 17 - Visualização do amplicon correspondente ao gene que codifica para a cistatina de citros CsinCPI-2 em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo.....	59
Figura 18 - Visualização do amplicon correspondente ao gene que codifica para a cistatina de citros CclemCPI-1 em gel de agarose 1%, contendo prometo de etídeo.....	59
Figura 19 - Análise de restrição das construções CTV316-4_Cistatina com as enzimas de restrição <i>Pst</i> I e <i>Stu</i> I. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.	60
Figura 20 - Visualização das reações de clivagem apresentada de forma esquemática para a confirmação do perfil de bandas esperado para o CTV316-4, clivados com a enzima <i>Eco</i> RV. Visualização em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.	61
Figura 21 - Análise de restrição das construções 35S CTV 316-4-CsinCPI-2 com a enzima de restrição <i>Pac</i> I e <i>Stu</i> I. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.....	62
Figura 22 - Análise de restrição de clones do plasmídeo vazio (T36) CTV316-4 após restrição com a enzima <i>Eco</i> RV visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.....	62
Figura 23 - Alinhamento entre o resultado do sequenciamento do gene codante à CsinCPI-2 subclonado em vetor CTV e a sequência de CsinCPI-2 de referência	63
Figura 24 - Alinhamento entre o resultado do sequenciamento do gene codante à CsinCPI-2 subclonado em vetor CTV e a sequência de CsinCPI-2 de referência	63
Figura 25 - Sintomas de infecção sistêmica mediadas por CTV visíveis em <i>N. benthamiana</i> (Ambrós et al., 2011) após cerca de 60 d.p.i da suspensão de <i>A. tumefaciens</i> transformadas com as construções T36 CTV316-4, CTV316-4_CsinCPI-2 e CTV316-4_CclemCPI-1.....	64

Figura 26 - Plantas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas com a construção CTV33-23_GFP, utilizada como controle positivo do experimento.....	65
Figura 27 - Esquema representativo do teste de ELISA realizado para confirmar a presença ou ausência do Citrus Tristeza Virus em <i>Nicotiana benthamiana</i> baseada na densidade óptica, em 405 nm de comprimento de onda.....	66
Figura 28 - Confirmação da presença dos genes-alvo em exemplares de <i>Citrus macrophylla</i> previamente inoculadas com Citrus Tristeza Virus.....	68
Figura 29 - Gráfico com o número médio de ovos de <i>D. citri</i> em <i>C. macrophylla</i>	69
Figura 30 - Gráfico com o número médio de ninfas de <i>D. citri</i> eclodidas em <i>C. macrophylla</i>	70
Figura 31 - Gráfico com média da viabilidade dos ovos de <i>D. citri</i> em <i>C. macrophylla</i>	70
Figura 32 - Gráfico com média da viabilidade ninfal de <i>D. citri</i> em <i>C. macrophylla</i>	71
Figura 33 - Vetores de expressão para Yeast two-hybrid.....	84
Figura 34 - Dissecção do intestino médio de <i>Diaphorina citri</i> visto ao estereomicroscópio.	86
Figura 35 - Dissecção de ovário, glândulas salivares e intestino de <i>Diaphorina citri</i> vista ao estereomicroscópio.....	88
Figura 36 - Ovos em incubação artificial para teste de eclosão.....	91
Figura 37 - Representação esquemática da dieta artificial para <i>D. citri</i>	92
Figura 38 - Produtos de PCR usando os primers específicos para Y2H, visualizados em gel de agarose a 1%.....	94
Figura 39 - Dupla digestão dos fragmentos de cistatinas e catepsinas e dos vetores pGADT7 e pGBKT7.....	94

Figura 40 - Multialinhamento do sequenciamento de DNA das construções de Y2H.....	95
Figura 41- Colônias transformantes após ensaio de Y2H.....	96
Figura 42 - Expressão relativa dos genes DcCathB e DcCathL da análise de <i>D. citri</i> saudável (CLas -) e infectado (CLas +) por RT-qPCR.....	97
Figura 43 - Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH) para detectar transcritos de <i>DcCathB</i> em intestino dissecados de <i>Diaphorina citri</i> saudável (CLas -) e infectado (CLas +).....	99
Figura 44 - Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH) para detectar transcritos de <i>DcCathL</i> em tecidos intestinais dissecados de <i>Diaphorina citri</i> saudável (CLas -) e infectada (CLas +).....	100
Figura 45 - Imunomarcagem para detectar a proteína DcCathL em tecidos intestinais dissecados de <i>Diaphorina citri</i> saudável (CLas -) e infectado (CLas +).....	102
Figura 46 - Imunomarcagem para detectar a proteína DcCathL em tecidos de ovário dissecados de <i>Diaphorina citri</i> saudável (CLas -) e infectado (CLas +).....	103
Figura 47- Imunomarcagem para detectar a proteína DcCathL em glândulas salivares dissecadas de <i>Diaphorina citri</i> saudável (CLas -) e infectado (CLas +).....	104
Figura 48- Predição <i>in silico</i> da localização subcelular da proteína DcCathB (Protter).....	104
Figura 49 - Predição <i>in silico</i> da localização subcelular da proteína DcCathL (Protter).....	105
Figura 50 - Predição <i>in silico</i> da localização subcelular da proteína DcCathB (DeepLoc 2.0).....	105
Figura 51 - Predição <i>in silico</i> da localização subcelular da proteína DcCathL (DeepLoc 2.0).....	106
Figura 52 - SDS-PAGE 15% mostrando as proteínas recombinantes purificadas.....	107

Figura 53 - Cultivo para eclosão de ovos de <i>D. citri</i> em meio artificial.....	107
Figura 54 - Cultivo artificial para ensaio de eclosão de ovos de <i>Diaphorina citri</i>	108
Figura 55 - Ninfa de <i>Diaphorina citri</i> se alimentando em meio artificial.....	109
Figura 56 - Gráfico representativo da taxa de eclosão de ovos de <i>Diaphorina citri</i> em meio artificial na presença e ausência da proteína CsinCPI-2 em função do tempo.....	109
Figura 57 - Captura de rGFP de dieta artificial por <i>D. citri</i>	110
Figura 58 - Regressão de riscos proporcionais de Cox mostrando a probabilidade de sobrevivência em 72h de avaliação para ninfas de <i>D. citri</i> em ensaio de alimentação em Kimwipes®.....	111
Figura 59 - Regressão de riscos proporcionais de Cox mostrando a probabilidade de sobrevivência em 72h de avaliação para adultos e ninfas saudáveis de <i>D. citri</i>	112
Figura 60 – Imagem de microscopia confocal tridimensional do intestino médio, ovário e glândula salivar de <i>D. citri</i>	156
Figura 61 – Imagem do par de glândulas salivares, ovário e intestino médio de <i>D. citri</i> . Visão ampliada em estereomicroscópio.....	157
Figura 62 – Imagem de microscopia confocal para detecção de DcCathL no intestino médio de <i>D. citri</i>	158
Figura 63 – Imagem de microscopia confocal para detecção de DcCathL no ovário de <i>D. citri</i>	159
Figura 64 – Observação em estereomicroscópio da alimentação de ninfas de 4º ínstar de <i>D. citri</i> em dieta artificial com Kimwipes®.....	160
Figura 65 – Limites de probabilidade da predição da localização subcelular do DeepLoc 2.0	161

LISTA DE TABELAS

	pg.
Tabela 1: Sequência de primers específicos para as cistatinas CclemCPI-1 e CsinCPI-2.....	47
Tabela 2: Sequência de primers para CPm e CP do vírus CTV	57
Tabela 3: Sequência de primers para Y2H.....	85
Tabela 4: Sequência de primers para avaliação da expressão gênica	86
Tabela 5: Sondas utilizadas no ensaio de FISH	87
Tabela 6: Sequência de aminoácidos das catepsinas de <i>D. citri</i> DcCathB e DcCathL.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AD	<i>Activation Domain</i>
α	Alfa
BD	<i>Binding Domain</i>
BEPE	Bolsa estágio de Pesquisa no Exterior
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Grupamento Carboxi-terminal
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
cDNA	DNA complementar
CLam	<i>Candidatus Liberibacter americanus</i>
CLaf	<i>Candidatus Liberibacter africanus</i>
CLas	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>
CLas +/-	Presença ou ausência da bactéria CLas
CP	<i>Major coat protein</i>
CPI	<i>Cysteine peptidase inhibitor</i>
CPm	<i>Minor coat protein</i>
CclemCPI-1	<i>Cysteine Peptidase Inhibitor 1 of Citrus clementina</i>
cm	centímetros
CREC	<i>Citrus Research and Education Center</i>
CsinCPI-2	<i>Cysteine Peptidase Inhibitor 2 of Citrus sinensis</i>
Cy3	<i>Cyanine 3 Dye</i>

Cy5	<i>Cyanine 5 Dye</i>
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DcCathB	<i>Diaphorina citri Cathepsin B-like</i>
DcCathL	<i>Diaphorina citri Cathepsin L-like</i>
DDO	<i>Double Dropout medium</i>
dF	<i>Degrees of Freedom</i> ; graus de liberdade
d.p.i	Dia(s) posterior (es) a inoculação
D.O.	Densidade óptica
dsRNAs	<i>Double-stranded RNAs</i>
F	Média entre duas variâncias
♀	Fêmea
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FUNDECITRUS	Fundo de Defesa da Citricultura
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
°	Grau ou ordem
°C	Graus Célsius
HCl	Ácido clorídrico
HLB	<i>Huanglongbing</i>
HEL	Helicase
HSP70	<i>Heat-Shock Protein 70</i>
IPs	Inibidores de peptidases
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton

LB	<i>Lysogeny Broth</i>
♂	Macho
mm	milímetro
µg	micrograma
µL	microlitro
M	Molar
mM	milimolar
mL	mililitros
MSS	<i>Mix of Silencing Supressors</i>
MT	Metiltransferase
N	Grupamento amino-terminal
NaCl	Cloreto de sódio
NC	<i>Negative control</i>
Ni-NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i>
nm	nanômetros
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
P	<i>P-Value</i>
PC	<i>Positive control</i>
PIB	Produto Interno Bruto
pH	Ponto hidrogeniônico
%	Porcento/Porcentagem
pb	pares de bases
pmol	picomols

PRO	Protease
qPCR	<i>quantitative PCR</i>
RdRp	<i>RNA-dependent RNA Polymerase</i>
RNAi	RNA de interferência
SD	<i>Synthetic Defined medium</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
siRNAs	<i>Small interfering RNAs</i>
spp.	Espécies
ssRNA	<i>Single-stranded RNA</i>
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
UTR	<i>Untranslated Regions</i>
UR	Umidade Relativa
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UV	Ultravioleta
Vg A1-like	<i>Vitellogenin A1-like</i>
Y2H	<i>Yeast Two-hybrid</i> ; duplo-híbrido em levedura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	28
1.1 Citricultura	28
1.2 Huanglongbing (HLB)	29
1.3 <i>Diaphorina citri</i>	31
1.4 Peptidases	34
1.4.1 Cisteíno peptidases	34
1.5 Inibidores de cisteíno peptidases (cistatinas)	36
CAPÍTULO I: Utilização do vetor viral CTV para superexpressão de cistatinas em citros visando o controle de <i>D. citri</i>	39
1 INTRODUÇÃO	39
1.1 Citrus Tristeza Virus (CTV): organização genômica e funções gênicas	39
1.2 A doença Tristeza dos Citros	40
1.3 Utilização de vetor baseado em CTV para expressão de proteínas em citros	42
2 OBJETIVOS	46
2.1 Objetivos Específicos	46
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Isolamento das cistatinas de citros	47
3.2 Purificação do produto de amplificação e clonagem no vetor viral (T36) CTV316-4	47
3.3 Transformação de células bacterianas e isolamento do DNA de interesse	49

3.4	Preparação do material vegetal	51
3.5	Transformação em <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	51
3.6	Agroinfiltração em <i>Nicotiana benthamiana</i>	51
3.7	Ensaio ELISA composto de <i>Nicotiana benthamiana</i> agroinfiltradas e <i>Citrus macrophylla</i> para detecção do CTV	53
3.8	Isolamento dos vírions de CTV	53
3.9	Inoculação mecânica (<i>Bark-flap</i>) dos vírions recombinantes em citros	54
3.10	Confirmação da manutenção dos genes de interesse nas plantas transformadas com CTV	56
3.11	Ensaio biológico entre <i>D. citri</i> e plantas de citros contendo CTV	57
3.12	Análise estatística	58
4	RESULTADOS	59
4.1	Isolamento das cistatinas de citros e purificação	59
4.2	Confirmação das construções moleculares obtidas com o vetor viral T36 CTV316-4	60
4.3	Ensaio ELISA de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas	66
4.4	Inoculação <i>Bark-flap</i> dos vírions recombinantes em <i>C. macrophylla</i> e confirmação da presença dos genes de interesse carregados pelo vírus	67
4.5	Ensaio de inoculação do psílídeo <i>D. citri</i> em plantas contendo as construções CTV-cistatinas	69
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÃO	77

CAPÍTULO II: Estudos funcionais utilizando dietas artificiais contendo

cistatinas recombinantes, visando desenvolver estratégias para o manejo de *D. citri* 78

1 INTRODUÇÃO	78
1.1 Interação vetor – bactéria – planta	78
1.2 Interação proteína-proteína	80
2 OBJETIVOS	83
2.1 Objetivos específicos	83
3 MATERIAL E MÉTODOS	84
3.1 Manutenção dos insetos e material vegetal	84
3.2 Ensaio de duplo híbrido ou <i>Yeast two-hybrid</i> (Y2H)	84
3.3 Isolamento de RNA e síntese de cDNA de <i>D. citri</i> infectados ou livres de CLas	85
3.4 PCR quantitativa (qPCR) de genes correspondentes às catepsinas <i>DcCathB</i> e <i>DcCathL</i> de <i>D. citri</i> infectados ou livres da bactéria CLas	85
3.5 Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH) para avaliação da expressão gênica de <i>DcCathB</i> e <i>DcCathL</i> na presença e ausência da bactéria CLas	86
3.6 Imunolocalização da proteína DcCathL em tecidos dissecados de <i>D. citri</i>	87
3.7 Predição <i>in silico</i> da localização subcelular das proteínas DcCathB e DcCathL	88
3.8 Produção de CclemCPI-1 e CsinCPI-2 recombinantes para teste em dieta artificial de <i>D. citri</i>	89
3.9 Ensaio de eclosão de ovos de <i>D. citri</i> na presença e ausência de cistatinas recombinantes	90

3.10 Bioensaio para alimentação de ninfas de <i>D. citri</i> em dieta artificial utilizando membranas de Kimwipes®	91
3.11 Bioensaio de alimentação com sachê de parafilme para adultos de <i>D. citri</i> na presença e ausência das cistatinas	93
3.12 Análise estatística	93
4 RESULTADOS	94
4.1 Ensaio Y2H	94
4.2 Análise da expressão gênica por qPCR e FISH para populações de <i>D. citri</i> CLas - e CLas +	97
4.3 Imunolocalização da proteína DcCathL em tecidos dissecados de <i>D. citri</i>	101
4.4 Predição <i>in silico</i> da localização subcelular das catepsinas DcCathB e DcCathL	104
4.5 Produção recombinante das proteínas CclemCPI-1 e CsinCPI-2 para testes em dieta artificial	106
4.6 Ensaio com ovos de <i>D. citri</i> para verificar o padrão de eclosão de ovos na presença ou ausência da cistatina CsinCPI-2	107
4.7 Ensaio de dieta artificial para ninfas e adultos de <i>D. citri</i>	110
5 DISCUSSÃO	113
6 CONCLUSÃO	122
REFERÊNCIAS	124

APÊNDICE I	156
APÊNDICE II	157
APÊNDICE III	158
APÊNDICE IV	159
APÊNDICE V	160
ANEXO I	161

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Citricultura

Na agricultura mundial, as frutas cítricas ocupam posição importante no mercado, com 145 países envolvidos numa produção que ultrapassa 145 milhões de toneladas ao ano (Knoema, 2019; FAO 2021). Apesar da produção citrícola estar largamente distribuída mundialmente, mais de 70% da produção de citros está concentrada em China, Brasil, Índia, México e Estados Unidos (FAO, 2021) (Figura 1), com destaque para o Brasil considerado o maior produtor de laranjas doces e exportador de 76% do suco da fruta (FAO, 2021; USDA, 2021).

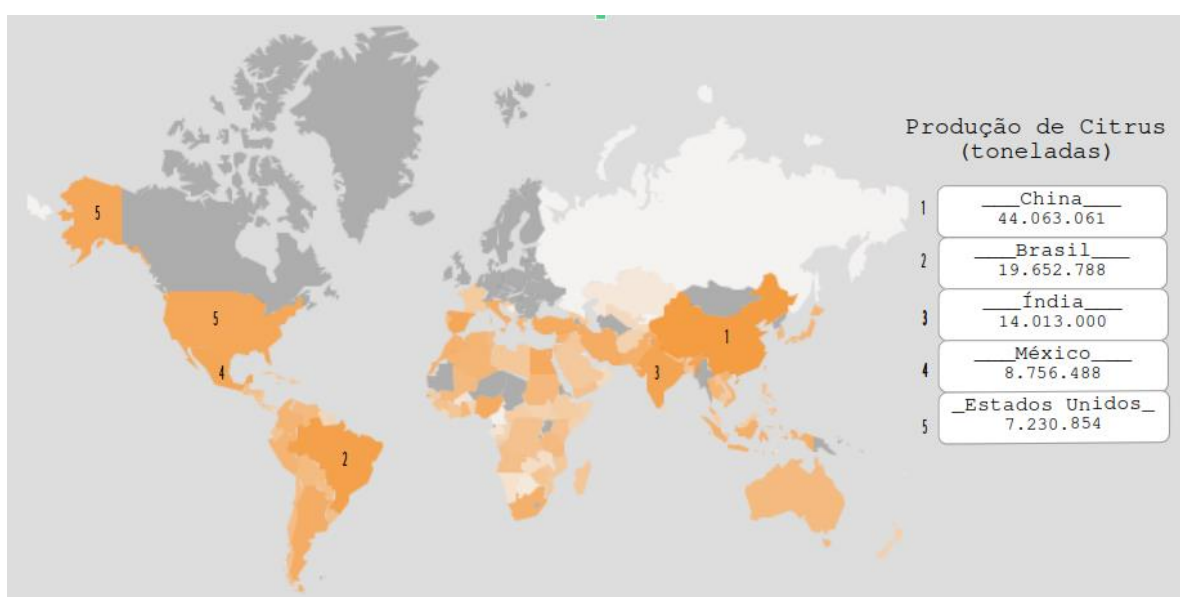


Fig. 1- Mapa com destaque em laranja para os países produtores de citros ao longo do mundo. Destaque para os cinco maiores produtores de citros em 2020: 1- China; 2- Brasil; 3- Índia; 4- México; 5- Estados Unidos. Fonte: Adaptado de Atlas Big. Disponível em: <https://www.atlasbig.com/en-us/countries-total-citrus-production>

Dessa forma, a citricultura se mostra de grande relevância para a economia interna brasileira, com geração de mais 230 mil empregos diretos e indiretos, e movimentação de mais de US\$ 6,5 bilhões do PIB nacional (Neves e Tronbin, 2017). Considerando os índices de produtividade, a safra da laranja 2022/23 do cinturão citrícola encerrou em 314,21 milhões de caixas de 40,8 kg, resultado este 0,86% menor do que o previsto no ano anterior (Fundecitrus, 2023). Por sua vez, a estimativa para a safra 2023/24 é de 309,34 milhões de caixas, caracterizando uma redução de 1,55% na produção em relação à safra passada (Fundecitrus, 2023).

Apesar das significativas contribuições para o setor, os maiores produtores têm sofrido perdas significativas, principalmente ligadas a climas desfavoráveis e a graves problemas fitossanitários (Fundecitrus, 2021; USDA, 2021). Nesse mesmo âmbito, dentre os fatores que afetam a agricultura, as perdas ocasionadas por pragas e parasitas representam as suas maiores ameaças (Castro et al., 2023), onde estima-se uma perda na produtividade global de 20-40% devido a pragas e patógenos vegetais (Finegold et al., 2019). Curiosamente, estima-se que de 18-26% dessas perdas de produtividade são atribuídas especificamente aos danos associados aos artrópodes, com prejuízos que ultrapassam os US\$ 470 bilhões (Culliney, 2014).

Na citricultura, dentre as diversas doenças que atingem os citros (leprose, pinta preta, cancro cítrico, tristeza dos citros, clorose variegada dos citros) destaca-se o Huanglongbing (HLB) (Fundecitrus, 2021; USDA, 2021), considerado atualmente a doença mais séria do gênero (McCleane e Schwarz 1970; Bové, 2006), sem nenhum método efetivo de controle existente. Dados recentes demonstram que a incidência do HLB no “cinturão cítrico, região que compreende municípios do estado de São Paulo e Sudoeste/Triângulo Mineiro (Fundecitrus, 2022), subiu de 24,42% para 38,06% em 2023, um aumento que corresponde a 56% (Fundecitrus, 2023). Além disso, de forma muito alarmante, os índices mostram que aproximadamente 100% dos pomares no estado da Flórida apresentam contaminação com a doença HLB, o que reduz drasticamente a produtividade e eleva os custos (CEPEA, 2023). Tudo isso reforça a necessidade de um estudo mais aprofundado da doença, bem como o desenvolvimento de uma estratégia eficiente para a sua mitigação.

1.2 Huanglongbing (HLB)

O HLB também denominado *Greening* dos citros, vem causando sérios danos aos pomares de citros em vários países. É altamente destrutivo, endêmico na Ásia, África, América do Norte e América do Sul, e foi reportado pela primeira vez no Brasil cerca de vinte anos atrás (Coletta-Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005a; Manjunath et al., 2008).

Quanto aos agentes associados ao HLB, as bactérias *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) e *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) são disseminadas pelo vetor natural *Diaphorina citri* enquanto a bactéria *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) é dispersa por outro psíldeo denominado *Tryoza eritreae* (Bové, 2006). De acordo, o termo ‘*Candidatus*’ é utilizado para registrar taxas procarióticas putativas, onde não existe uma descrição taxonômica tradicional, apenas a identificação baseada no sequenciamento genômico

e a observação de células (Murray e Stackebrandt, 1995). As três espécies bacterianas são do tipo Gram-negativa e pertencem a subdivisão α das Proteobactérias (Jagoueix et al., 1994). Apresentam colonização restrita ao floema vegetal, em que CLas é atualmente a espécie mais prevalente na citricultura (Clark et al., 2018; Bassanezi et al., 2020). Assim, o complexo patossistema do HLB compreende a relação entre: bactéria (ex. CLas), o psíldeo (ex. *D. citri*) e plantas do gênero *Citrus* spp. (Killiny et al., 2022).

A gravidade da doença se deve a sua rápida disseminação, a severidade dos danos provocados aos frutos, e a dificuldade de manejo (Bové, 2006), que é intensificada devido a impossibilidade de cultivo in vitro da bactéria (Merfa et al., 2019). Com isso, o HLB tem sido disseminando expressivamente por todas as regiões citrícolas do mundo, ameaçando severamente a citricultura.

De modo geral, os sintomas do HLB são principalmente manchas amareladas assimétricas nas folhas, frutos menores e assimétricos com inversão de coloração, queda precoce dos frutos e presença de sementes abortadas, frutos apresentando menor teor de suco, além do suco ser caracteristicamente mais ácido (Figura 2), inviabilizando por vezes sua comercialização (Bové, 2006; Tipu et al., 2021).

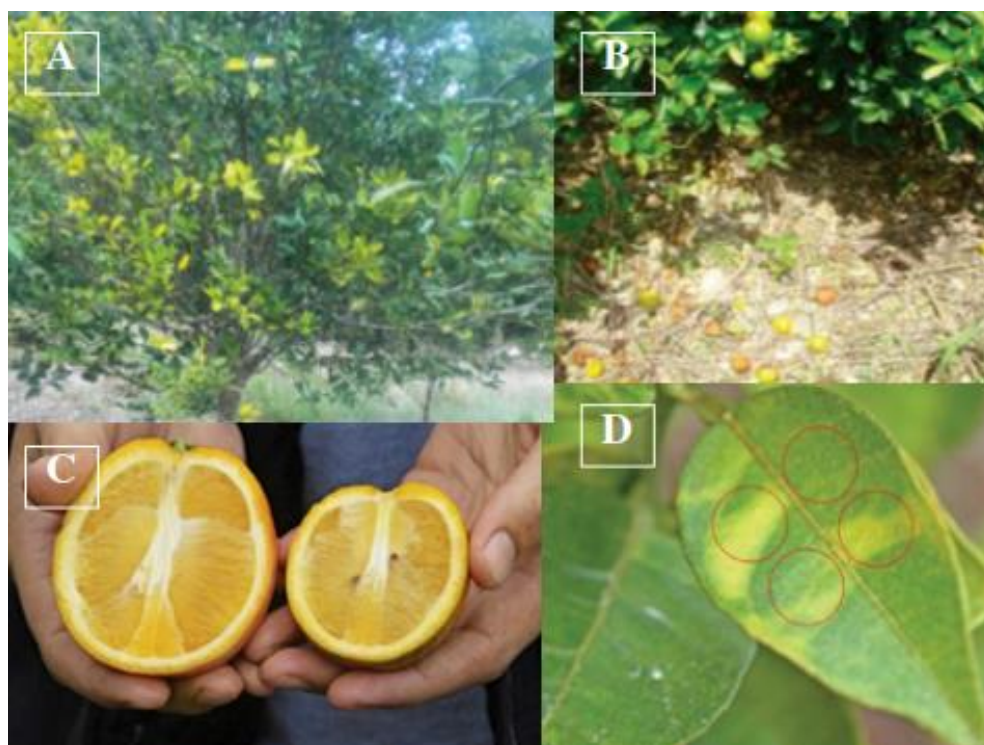


Fig. 2 – Principais sintomas do HLB em citros. A: Ramos amarelados; **B:** Queda precoce e exacerbada de frutos; **C:** fruto menor (à direita) em relação a um fruto saudável (à esquerda); **D:** folha apresentando manchas mosqueadas amarelas. Fonte: Adaptado de Tipu et al., 2021.

Esses sintomas estão intimamente ligados a colonização da bactéria *Candidatus Liberibacter spp.* ao floema (Figura 3), pois devido ao movimento das bactérias no interior das raízes e das folhas, os tecidos do floema destas duas áreas ficam significativamente bloqueados (Figura 3) limitando o movimento de nutrientes e açúcares nos tecidos internos (Bendix e Lewis, 2018) resultando nos sintomas supramencionados e, eventualmente, na morte da árvore (FAO, 2013).

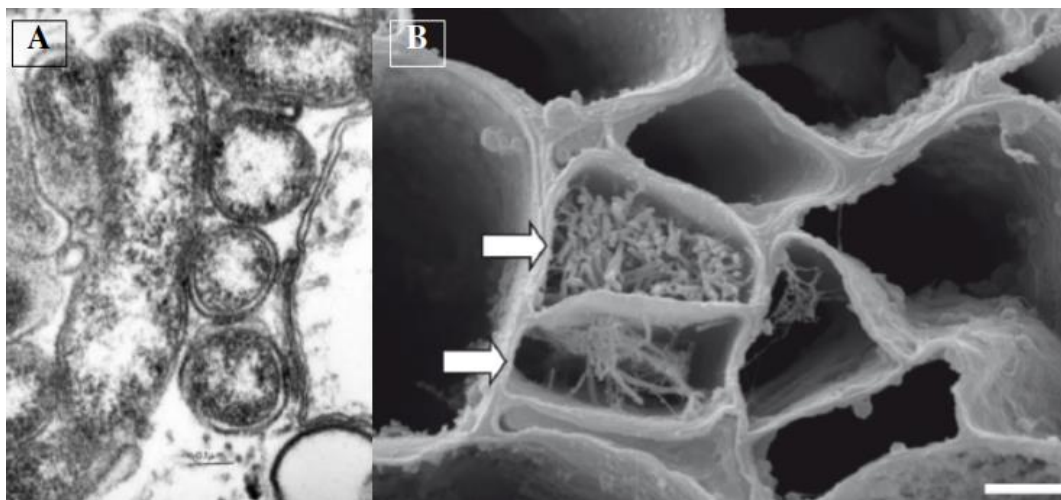


Fig. 3 – Colonização do floema vegetal por *Candidatus Liberibacter spp.* **A:** *Candidatus Liberibacter* em microscopia de transmissão em células do floema de laranja; **B:** *Candidatus Liberibacter* em microscopia eletrônica de varredura no floema de vinca. Fonte: Adaptado de Tanaka et al, 2007 e Machado et al., 2010.

Assim, o HLB se faz uma doença de difícil manejo devido à natureza não específica de seus sintomas, latência prolongada da doença, distribuição irregular do patógeno na planta, efeitos do ambiente na expressão dos sintomas e multiplicação da bactéria, e na tolerância da planta e do vetor *D. citri* ao patógeno (Manjunath et al., 2008).

1.3 *Diaphorina citri*

O psílídeo *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) (Kuwayama, 1907), também conhecido como psílídeo asiático dos citros, foi descrito pela primeira vez em *Citrus spp.* na cidade de Shinchiku, Taiwan em 1907. *D. citri* possui uma ampla distribuição geográfica, sendo um inseto cosmopolita, tendo sido registrado no Brasil pela primeira vez na década de 40 (Costa Lima, 1942), sendo atribuída à espécie uma importância secundária até que a doença HLB foi confirmada nos pomares do Estado de São Paulo em 2004 (Coletta-Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005a). O ciclo de vida de *D. citri* compreende as fases de ovo, ninfa (com cinco mudas) e a fase adulta (Hall, 2008) (Figura 4), podendo o ciclo completo variar de 15-47 dias dependendo de fatores climáticos (Halbert e Manjunath, 2004; Tsai e Liu., 2000).



Fig. 4- Ciclo de vida do inseto *D. citri*. A: Da esquerda para a direita tem-se: ovo, ninfa no 1º ínstar, 2º ínstar, 3º ínstar, 4º ínstar e 5º ínstar; B: adulto recém emergido à esquerda e adultos maduros à direita. Fonte: elaborado pela autora.

D. citri é um inseto do tipo sugador, e insere seu estilete bucal no interior dos tecidos vegetais para se alimentar da seiva elaborada presente no floema (Hall, 2008). De modo geral, o inseto é pequeno, sendo que em média o ovo tem comprimento de 0,31 mm e 0,14 mm de largura, com o adulto alcançando um comprimento que varia de 2-3,3 mm. Diferentemente do estágio ninfal, o psilídeo adulto é ativo, capaz de realizar saltos e voos curtos. Os insetos adultos são facilmente encontrados descansando ou se alimentando na planta com sua cabeça voltada para a superfície foliar e seu corpo numa posição que forma um ângulo de 45° em relação a superfície (Figura 5). As ninfas, por sua vez preferem caules e folhas jovens para se alimentarem, raramente se deslocam do local em que estão se alimentando e caracteristicamente excretam uma copiosa quantidade de *honeydew*, uma substância cerosa branca em formato de fio (Figura 5) (Tsai e Liu, 2000).



Fig. 5- *D. citri* nos estágios de ninfa e adultos e seu comportamento alimentar. A: Ninfa de 5º ínstar se alimentando em meio artificial iniciando a produção de *honeydew* (seta vermelha); **B:** Inseto adulto em meio artificial; **C:** Adultos e ninfas de *D. citri* se alimentando *in natura*. Com destaque para a excreção de *honeydew* pelas ninfas indicando a infestação na planta (seta vermelha). Fonte: Elaborada pela autora.

Há uma convergência quanto a localização da bactéria e a fonte de alimento de *D. citri*, dessa forma, um inseto ao se alimentar de uma planta de citros previamente infectada adquire a bactéria CLas. Tanto as ninfas como os adultos são capazes de adquirir o patógeno, ainda que as ninfas nos últimos instares têm-se mostrado frequentemente mais eficientes do que os adultos na aquisição de CLas (Ammar et al. 2016; Inoue et al. 2009; Pelz-Stelinski et al. 2010; Vyas et al., 2015). Na natureza, no entanto, o período de aquisição pode estender-se por todo o período ninfal (11 a 15 dias) (Grafton-Cardwell et al. 2013) já que as ninfas raramente se deslocam da planta para um novo hospedeiro até emergirem em adultos. Presume-se dessa forma que a aquisição e a multiplicação de CLas ocorrem principalmente nas ninfas, enquanto os adultos são responsáveis pela inoculação e pela propagação do HLB às árvores de citros não infectadas (Killiny, 2022). Sabe-se ainda que insetos que adquirem a bactéria somente na fase adulta apresentam uma capacidade de transmissão da bactéria bastante reduzida (Vyas et al., 2015).

Devido as dificuldades associadas ao cultivo de CLAs em laboratório, as tentativas empregadas para desacelerar a disseminação do HLB tem-se concentrado em controlar o inseto-vetor da doença (Castro et al., 2023; Ibanez et al., 2023). Apesar do uso de pesticidas químicos ser bem-estabelecido para o combate de diversas pragas, o uso impróprio de tais substâncias têm sido associado a contaminação do solo, ar, e água, além de resultar na seleção de pragas resistentes (Bilal et al., 2019; Rousis et al., 2021; Pérez-Lucas, et al., 2019; de Souza Guida et al., 2018; Deknock et al., 2019), reforçando, assim, a necessidade do desenvolvimento de alternativas seguras e menos danosas ao meio-ambiente (Carvalho, 2017).

De acordo, organismos da classe Insecta, o que inclui os psilídeos, obtém nutrientes essenciais através de atividades proteolíticas durante a digestão, sendo que a hidrólise eficiente das proteínas vegetais, por exemplo, são cruciais para gerar aminoácidos livres e garantir sua nutrição e sobrevivência. Assim, considerando que as peptidases são as enzimas responsáveis pela catálise da quebra proteica, essas moléculas se tornam alvos potenciais no combate a tais pragas que ameaçam a agricultura (Martinez et al., 2016; Ibanez et al., 2023).

1.4 Peptidases

As peptidases são enzimas que promovem a clivagem de proteínas ou peptídeos e estão envolvidas em processos digestivos, ativação de proenzimas e em diversos outros processos fisiológicos, atuando tanto no meio intracelular quanto extracelular (Rawlings e Barret, 1994). Podem ser divididas em dois grupos: exopeptidases e endopeptidases, dependendo do seu sítio de ação. As exopeptidases clivam as ligações peptídicas próximas aos grupamentos Amino (N) ou Carboxi (C) terminal do substrato, enquanto as endopeptidases atacam as ligações peptídicas distantes dos grupos terminais (Rawlings e Barret, 1994). As peptidases podem ainda ser subdivididas em seis grandes classes: serino peptidases, glutamil peptidases, cisteíno peptidases, aspartil peptidases, metalo peptidases e treonino peptidases, de acordo com o resíduo de aminoácido presente no seu sítio ativo, mecanismo de ação, similaridades de sequências de aminoácidos e estruturas tridimensionais das proteínas, categoria de inibidores e pH ótimo de atividade (Rawlings e Barret, 2004; Rawlings et al., 2018).

1.4.1 Cisteíno peptidases

As cisteíno peptidases são caracterizadas por conterem um resíduo de cisteína em seu sítio ativo, e estão agrupadas em onze clãs de acordo com a sua origem evolutiva. O clã CA é

o maior e mais estudado das cisteíno peptidases e compreende as catepsinas, junto a um grande número de outras cisteíno peptidases pertencentes à família C1 (*papain-like*), que inclui endopeptidases de vírus, protozoários, plantas e animais e exopeptidases de bactérias, fungos e animais (Rawlings e Barret, 1994; Rawlings e Barret, 2004; Rawlings et al., 2018).

O mecanismo catalítico, das enzimas da família C1, é dado, primeiramente, pela ligação entre a enzima livre e o substrato, resultando no intermediário tetraédrico. Posteriormente, há a acilação da peptidase com formação e liberação do primeiro produto enzimático, o grupo amino $R'NH_2$. No terceiro passo, a acil-enzima reage com uma molécula de água gerando um segundo produto enzimático ($RCOOH$); nessa fase ocorre a deacilação da enzima. A liberação deste produto leva à regeneração da enzima livre (Cstorer e Ménard, 1994) (Figura 6).

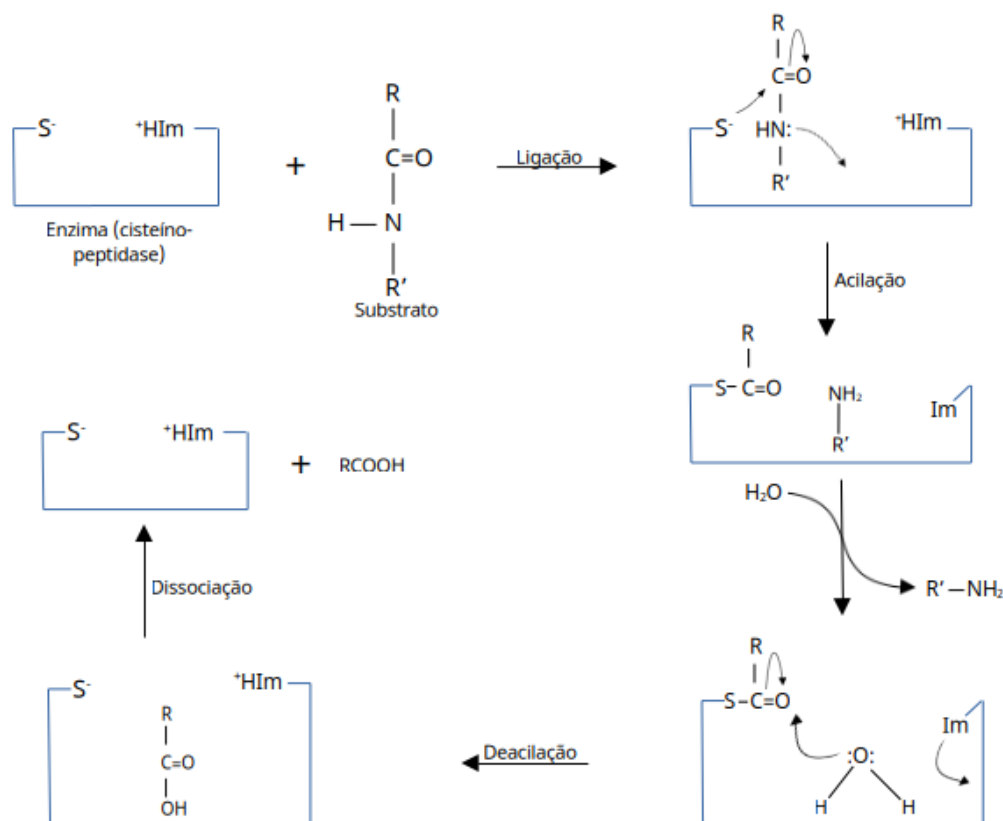


Fig. 6 – Esquema representativo da atividade proteolítica de uma cisteíno-peptidase contra um substrato genérico. Fonte: adaptado de RAO et al., 1998.

As cisteíno peptidases de invertebrados como ácaros, nematódeos, insetos, podem atuar em processos digestivos, se caracterizando como importante para o desenvolvimento do organismo (Terra e Ferreira, 1994; Verma et al., 2016; Xue et al., 2019), mas também são encontradas em diversos tecidos, o que indica a atuação dessas peptidases também em outros processos (Rawlings e Barret, 1994; Xue et al., 2019), como de defesa e metabolismo (Sajid e

McKerrow, 2002; Wiederanders, 2003). Em insetos, as Catepsinas B e L-like desempenham papéis-chave na digestão e estão envolvidas na embriogênese, ecdise, e sistema de defesa (Terra e Ferreira, 1994). Em *D. citri* especificamente, as catepsinas B e L-like denominadas DcCathB e DcCathL se mostraram altamente expressas no trato digestivo sugerindo a atuação como enzima digestiva além de uma expressão significativa durante o estágio de ovo, indicando um envolvimento no desenvolvimento embrionário (Ferrara et al., 2015; Ferrara et al., 2020), além da atuação no sistema imune (Yu et al., 2019), o que caracteriza essas moléculas como alvos importantes para o controle do inseto (Ibanez et al., 2023).

1.5 Inibidores de cisteíno peptidases (cistatinas)

Ao longo da evolução, as plantas parecem ter desenvolvido resposta imune envolvendo proteínas de defesa contra peptidases de fungos e insetos. Uma classe dessas moléculas que atuam na defesa vegetal são as proteínas inibidoras de peptidases (IPs), que são capazes de inibir peptidases que ocorrem em muitas espécies de insetos herbívoros, nematoides e fungos patogênicos (Selitrennikoff, 2001). Segundo Parra (1991), a quantidade e qualidade do alimento consumido afetam o desenvolvimento biológico dos insetos, que têm como exigências nutricionais básicas aminoácidos, vitaminas, sais minerais, carboidratos, lipídeos e esteroides. Quando insetos são submetidos a uma dieta artificial que contenha inibidores específicos para a principal classe de peptidases de seus intestinos conseqüentemente ocorre uma redução na assimilação de aminoácidos, onde estes têm seu crescimento e desenvolvimento retardados, bem como podem apresentar índices de mortalidade bastante significantes (Mc Manus & Burgess, 1995).

Durante a alimentação nos tecidos das plantas, os insetos encontram uma série de defesas bioquímicas, as quais podem ser sintetizadas em resposta ao ataque deles. Um desses mecanismos melhor estudado envolve a produção de IPs, que são proteínas capazes de se ligar as peptidases dos insetos, inibindo a sua atividade proteolítica de forma competitiva (Ryan, 1990). Os IPs naturais de cisteíno peptidases são chamados cistatinas. O nome cistatina foi dado originalmente por Barrett (1987) a um inibidor de cisteíno-peptidase do tipo papaína. De acordo com Martinez e Dias (2008) as cistatinas são proteínas que têm a capacidade de atenuar ou inibir a atividade de peptidases, pois podem agir intracelularmente ou extracelularmente formando um complexo com sua enzima alvo. Os IPs são produzidos em órgãos de estoque e sua síntese é induzida por ferimentos que constituem o complexo mecanismo de defesa de plantas (Gruden et al., 1998). A atividade dos inibidores deve-se a sua capacidade de formar

complexos estáveis com as proteases alvo, bloqueando, alterando ou prevenindo o acesso ao sítio ativo da enzima competitivamente (Haq et al., 2004) (Figura 7).

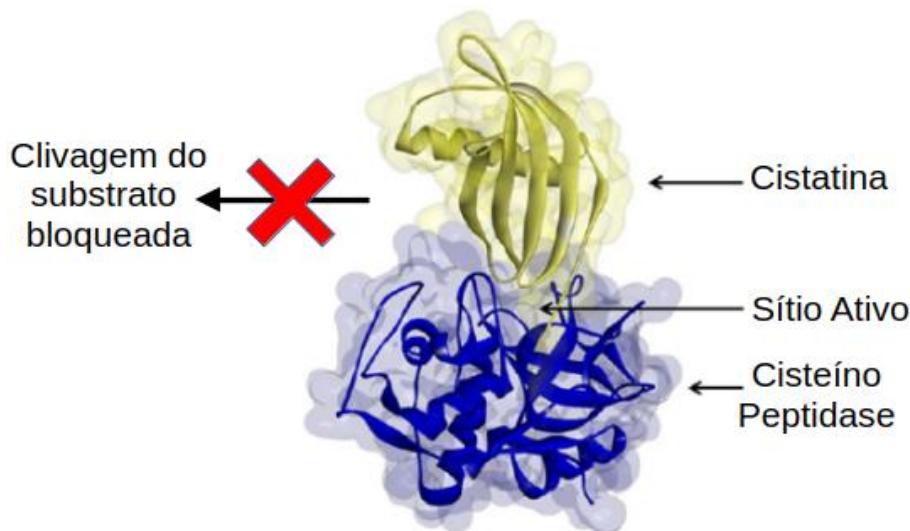


Fig. 7 – Representação da interação entre cistatina e uma cisteína-peptidase. A interação entre cistatina e peptidase resulta no bloqueio da proteólise. Fonte: Adaptado de Vorster et al., 2013.

As cistatinas têm como principal função garantir a proteção de células e tecidos contra a atividade proteolítica de peptidases lisossomais que podem ser liberadas ocasionalmente na morte celular programada ou na morte celular causada por doenças ou ataque de organismos, como insetos (Barrett e Kirschke, 1981). As fitocistatinas (cistatinas vegetais) são encontradas em plantas e possuem massa molecular entre 5 e 87 kDa (Reis e Margis, 2001). É a segunda classe de inibidores de peptidases mais estudada e têm sido caracterizada a partir de várias espécies de plantas, tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas, incluindo feijão de corda (Fernandes, et al., 1993), batata (Waldron et al., 1993), papaia (Song et al., 1995), castanha (Connors et al., 2002), cana-de-açúcar (Soares-Costa et al., 2002; Gianotti et al., 2006; Gianotti et al., 2008; Valadares et al., 2010; Santiago et al., 2017), citros (Schneider et al., 2020), entre outras.

O uso de IPs no desenvolvimento de plantas resistentes a insetos e patógenos é uma importante estratégia adotada e utilizada recentemente, na qual são inseridos os respectivos genes no genoma das plantas, possibilitando desta maneira, a obtenção de plantas com características melhoradas e resistentes ao ataque de pragas. Podemos citar alguns exemplos de plantas transgênicas expressando cistatinas, as quais apresentaram interferência no desenvolvimento e crescimento de insetos praga, possibilitando uma melhora na produção das culturas (Joanin et al., 2000; Lawrence e Koundal, 2002; Haq et al., 2004; Outchkourov et al., 2004; Ribeiro et al., 2008; Chen et al., 2014).

A realização de ensaios biológicos com insetos alimentados com plantas transgênicas expressando cistatinas se tornou um eficiente método para avaliar o efeito desses inibidores no crescimento e desenvolvimento desses organismos. Em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa observou-se, por exemplo, que larvas do inseto *Sphenophorus levis* alimentadas com cana-de-açúcar transgênica superexpressando o inibidor de cisteíno peptidase CaneCPI-1, apresentaram um atraso no seu crescimento e desenvolvimento e as plantas transgênicas foram menos danificadas após alimentação das larvas desse inseto quando comparadas com plantas não transgênicas (Schneider et al., 2017). Entretanto, estudos similares ainda não haviam sido realizados com a expressão de inibidores de cisteíno peptidases em citros.

Considerando que as cisteíno peptidases de *D. citri*, inseto vetor do HLB dos citros, foram elencadas como importantes alvos para o controle do inseto (Ibanez et al., 2023), estratégias utilizando um vetor viral para a superexpressão de cistatinas em citros se mostram como uma alternativa potencial para o controle do psílídeo *D. citri*.

CAPÍTULO I: Utilização do vetor viral CTV para superexpressão de cistatinas em citros visando o controle de *D. citri*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Citrus Tristeza Virus (CTV): organização genômica e funções gênicas

O *Citrus Tristeza Virus* (CTV), ou vírus da Tristeza dos citros é responsável por causar a Tristeza, uma importante doença dos citros. Dentre os vírus associados a patologias vegetais, o CTV se destaca como o maior vírus de RNA fita simples senso positivo (ssRNA (+); *single-stranded RNA*), com um genoma de 19,3 Kb (Folimonova, 2020). O CTV pertence ao gênero *Closterovirus*, família *Closteroviridae* e caracteristicamente infecta o floema de plantas da família *Rutaceae*, sendo transmitido para as plantas por um afídeo (Hemiptera: *Aphididae*) ou no *grafting* de material vegetal contaminado (Albiach-Marti, 2013). As partículas virais têm uma estrutura flexível com cerca de 2000 nm de comprimento e 11 nm de diâmetro (Figura 8A) e estão cobertas por duas proteínas do capsídeo, a CP (*major coat protein*; p25) ou proteína do capsídeo maior que cobre cerca de 97% da partícula viral e CPm (*minor coat protein*; p27), proteína do capsídeo menor, que cobre apenas 3% da extremidade viral (Febres et al., 1996; Albiach-Marti, 2013) (Figura 8B).

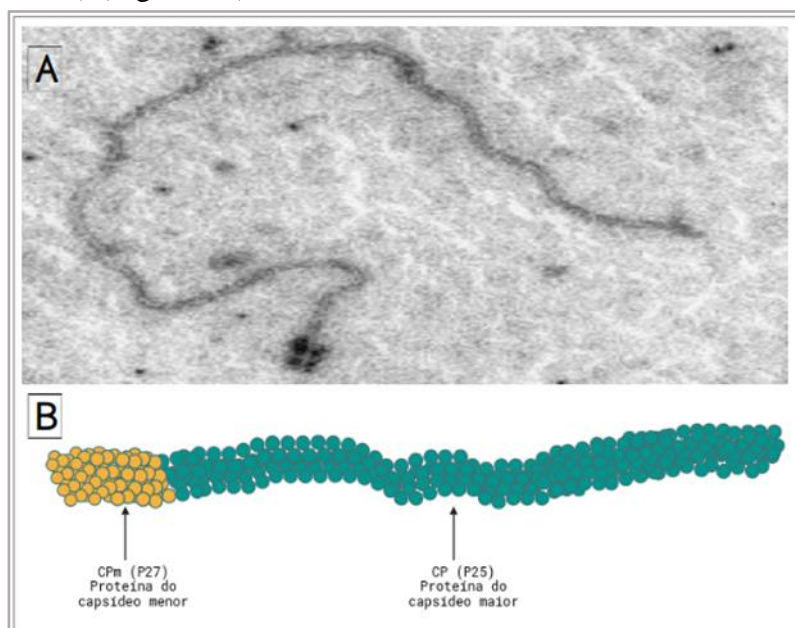


Fig. 8- Vírus da Tristeza do Citrus (CTV). A: uma micrografia eletrônica do CTV sob alta ampliação. O vírus tem uma estrutura em forma de bastão, típica de vírus filamentosos. B: Representação esquemática do vírion. O diagrama tem duas proteínas de revestimento ilustradas, denominadas proteína do capsídeo maior (CP) e proteína do capsídeo menor (CPm). A CP ou p25, é mostrada como uma série de unidades em verde formando a estrutura helicoidal responsável por encapsular o RNA viral e formar o corpo principal do vírion. A CPm, ou p27, é mostrada como uma série de unidades laranja na extremidade oposta. Fonte: Eletromicrografia, Lee et al., 1996. Representação esquemática, elaborado pela autora baseado em ViralZone (Expasy), <https://viralzone.expasy.org/286>

O genoma viral é organizado em 12 *Open Reading Frames* (ORFs) e duas regiões não traduzidas denominadas *Untranslated Regions* (UTR) nas extremidades 5' e 3' (Figura 9). A ORF 1a codifica para uma poliproteína com domínios semelhantes a Metiltransferase (MT) e Helicase (HEL). A ORF 1b codifica para uma proteína com um domínio do tipo RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (Figura 9). Ambas as ORFs 1a e 1b estão envolvidas na replicação do vírus. As ORFs p6, HSP70h, p61, CP e CPm (Figura 9) codificam proteínas necessárias para a montagem do vírion e seu movimento. A HSP70h é homóloga a HSP70, proteína *Heat-shock* pertencente a uma família de Chaperonas envolvidas na interação proteína-proteína, translocação entre organelas e o movimento intracelular (Karasev et al., 1995). A proteína p6 é necessária para infecção na planta hospedeira, e atua como proteína de movimento. HSP70h, p61 e CPm estão envolvidas na transmissão de CTV por insetos e CP, p20 e p23 têm a função de supressão do silenciamento pelo hospedeiro (Killiny et al., 2016). A proteína p33 é considerada multifuncional, pois é necessária para infecção em algumas variedades de citros; está associada ao movimento dos vírus nas plantas e influenciando a translocação sistêmica dos vírus, associada a capacidade de superinfecção do vírus (Folimonova, 2012).

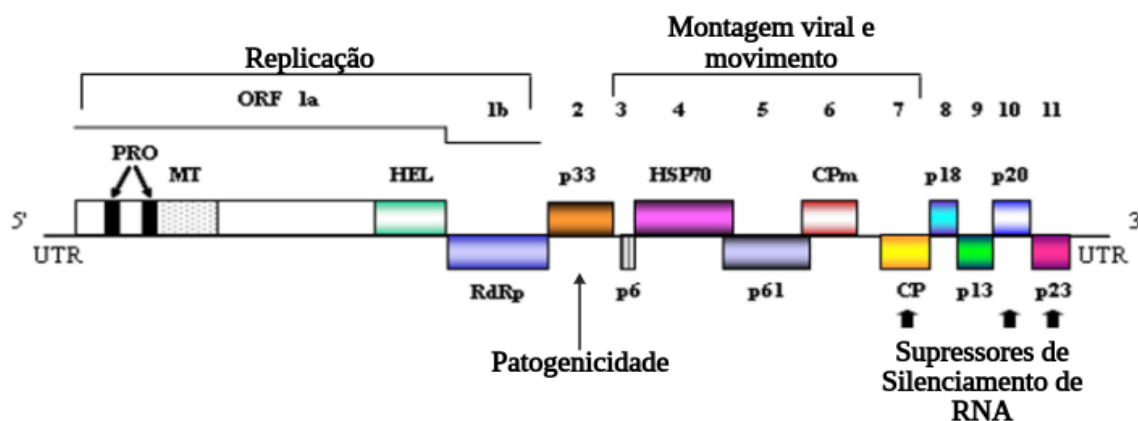


Fig. 9 - Representação esquemática do genoma do Citrus tristeza vírus (CTV). PRO-protease, MT-Metiltransferase, HEL- Helicase, RdRp- RNA polimerase dependente de RNA, CP- proteína capsidial. Os genes p6, HSP70, p61, p27 (CPm) e p25 (CP) codificam proteínas envolvidas na formação e transporte dos vírus. O gene p20 é responsável pela formação dos corpos amorfos de inclusão, o gene p23 codifica uma proteína de ligação ao RNA que regula a acumulação assimétrica do sentido positivo e negativo durante a replicação de RNA. As funções biológicas de p33 está associada à patogenicidade do vírus; e p33, p18 e p23 em conjunto estão associadas ao desenvolvimento da síndrome de stem-pitting (SP) nos hospedeiros vegetais (Karasev et al., 1995; Albiach-Marti, 2013). Fonte: Adaptado de Flores et al., 2013.

1.2 A doença Tristeza dos Citros

O CTV é o agente de uma das doenças virais mais importantes economicamente para a citricultura, a Tristeza dos citros. O termo “Tristeza” foi usado pela primeira vez por Moreira (1942), para descrever o rápido declínio que afetam as plantas (Bar-Joseph et al., 2008; Albiach-

Marti, 2013; Moreno et al., 2008; Roistacher et al., 2010), tendo sido observada pela primeira vez na África do Sul, e introduzida no Brasil em 1937 (Bennett e Costa, 1949).

Os principais sintomas provocados pelos isolados de CTV incluem diferentes tipos de caneluras (*stem-pitting*), amarelecimento foliar (*seedling yellow*), atrofiamento, clareamento das nervuras, e enrolamento das folhas (Dawson et al., 2015), além do declínio rápido das plantas (*quick decline*) (Figura 10) (Bar-Joseph et al., 1989; Moreno et al., 2008; Schneider, 1959).

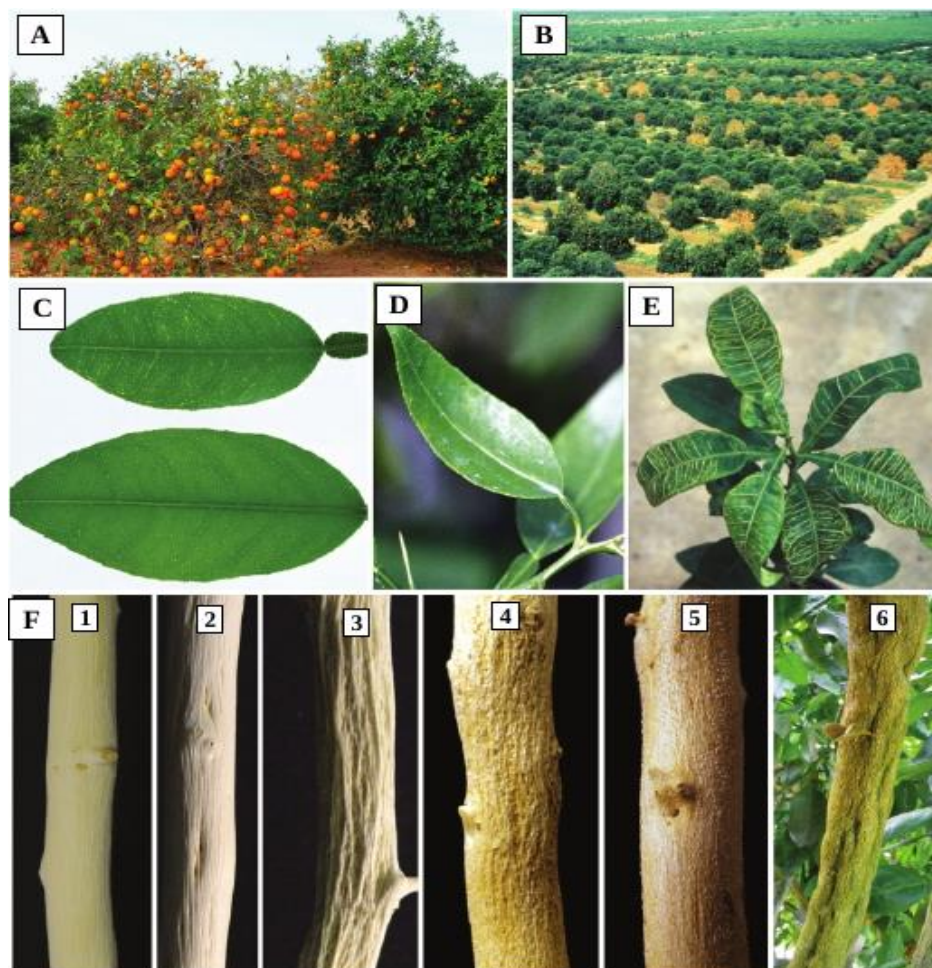


Fig. 10– Principais sintomas associados à doença da Tristeza do citros causadas pelo CTV. **A:** *quick decline* da árvore; **B:** pomares apresentando o declínio de árvores; **C:** palidez das nervuras, apresentada na folha na parte superior da imagem; **D:** *leaf cupping*, ou deformação foliar no formato de xícara; **E:** arrolhamento das nervuras foliares; **F:** sintomas de caneluras (*stem-pitting*) em caules com a casca removida (1-6): **1:** saudável; **2:** sintomas de canelura leve; **3:** canelura moderada; **4:** canelura severa; **5:** fissuras inversas; **6:** fissuras no caule grandes o suficiente para serem visíveis através da casca. Fonte: Adaptado de Dawson et al., 2015.

Na infecção da planta hospedeira, o vírus precisa adentrar a célula e sobrepujar a reposta de defesa vegetal, a fim de reprogramar a maquinaria celular da planta para a sua própria multiplicação. O processo infeccioso continua com a montagem de novas partículas virais que se movem célula-a-célula através do plasmodesmata, onde esse processo será completado com o movimento viral de longa distância via sistema vascular, resultando na colonização sistêmica da planta (Albiach-Marti, 2013).

1.3 Utilização de vetor baseado em CTV para expressão de proteínas em citros

Atualmente, técnicas de engenharia genética têm se tornado bem aceitas no estabelecimento de estratégias para o controle de pragas vegetais (Levy et al., 2018). Em especial, o uso de vetores baseados em vírus de plantas têm sido amplamente empregados para o estudo da função de genes e proteínas (Lu et al., 2003; Constantin et al., 2004; Ratcliff et al., 2001; Lee et al., 2012), além do uso no desenvolvimento de plantas resistentes à patógenos ou insetos por meio da superexpressão de proteínas ou do silenciamento gênico (Khan et al., 2013; Hajeri et al., 2014; Wang et al., 2009; Khan et al., 2015; Kolliopoulou et al., 2017).

Por exemplo, vetores de CTV destinados a entrega de RNAi (CTV-RNAi), foram bem sucedidos quando usados para entregar uma versão truncada do gene *Awd* em *D. citri* o que resultou na expressão reduzida do gene, uma vez que o psilídeo se alimentou nas plantas contendo o CTV-RNAi, causando má formação nas asas e alta mortalidade em adultos de *D. citri* (Hajeri et al., 2014). Do mesmo modo, o uso de vetor CTV-RNAi foi empregado, previamente por nosso grupo, para o silenciamento das catepsinas *DcCathL* e *DcCathB* de *D. citri* e o resultado foi uma consequente redução na expressão do gene *Vitelogenina AI-like* (*Vg AI-like*) implicando na diminuição do desenvolvimento de oócitos e comprometendo a maturação ovariana (Ibanez et al., 2023). Tais evidências corroboram o uso de CTV como ferramenta para a entrega de dsRNAs/siRNAs ou mesmo genes/proteínas via citros, visando genes alvos de *D. citri* (Hajeri et al., 2014; Ibanez et al., 2023) e seu possível manejo.

O uso desses vetores na elaboração de medidas de proteção de culturas se mostra muito atrativo, visto que o método tradicional via transgenia exigiria a remoção e a substituição por novas plantas modificadas, enquanto a estratégia baseada em vetores virais permite a adição de genes ou novas características às plantas-alvo já existentes no campo (El-Mohtar e Dawson, 2014).

Embora sua colonização seja restrita ao floema (Figura 1B), no laboratório o CTV pode ser transmitido mecanicamente a pequenas plantas cortando a casca e aplicando preparações de vírus por detrás da casca cortada (Garnsey et al., 1977; Garnsey et al., 1988). Além disso, o isolado T36 foi transmitido experimentalmente à *Nicotiana benthamiana* mecanicamente e por agroinoculação (Ambrós et al., 2011; Ambrós et al., 2013), possibilitando o uso do vírus como um vetor para expressão heteróloga em plantas. Embora sua colonização seja restrita ao floema (figura 1b), no laboratório o CTV pode ser transmitido mecanicamente a pequenas plantas cortando a casca e aplicando preparações de vírus por detrás da casca cortada (Garnsey et al., 1977; Garnsey et al., 1988). Além disso, o isolado T36 foi transmitido

experimentalmente à *Nicotiana benthamiana* mecanicamente e por agroinoculação (Ambrós et al., 2011; Ambrós et al., 2013), possibilitando o uso do vírus como um vetor para expressão heteróloga em plantas.

Em citros, vetores baseados em vírus foram criados pela manipulação do vírus CTV para a expressão heteróloga de proteínas (Satyanarayana et al., 2001; Folimonov et al., 2007; El-Mohtar e Dawson, 2014). A construção desses vetores para a expressão pode oferecer abordagens altamente eficazes, pois infecções de RNAs virais em plantas e insetos resultam na produção de grandes quantidades de transcritos e, conseqüentemente, resultando em grandes quantidades de proteínas. O CTV foi utilizado no desenvolvimento de um clone de cDNA a partir do genoma do isolado T36 *wild-type* (CTV-T36) (Satyanarayana et al., 2001).

A princípio, a utilização do CTV como vetor foi idealizada para o teste de genes potenciais para o melhoramento vegetal, e para o teste de genes antes da transformação direta em citros. No entanto, com a rápida disseminação do HLB desafiando a sobrevivência das indústrias citrícolas, criou-se uma premissa de que não existiria tempo hábil para o desenvolvimento de plantas transgênicas como estratégia de controle do HLB e subsistência de tais indústrias. Até o desenvolvimento de transgênicos, a notável estabilidade do CTV apresenta uma alternativa para seu uso direto em campo, já que ele pode ser utilizado para transferir novos genes para pomares em plena funcionalidade, sem a necessidade da remoção e replantação de árvores com características melhoradas (El-Mohtar e Dawson, 2014), trazendo uma solução mais rápida de proteção para os citros.

Quanto a funcionalidade do sistema, o genoma viral deve ser introduzido em células de plantas pela infiltração do tecido com cultura de *A. tumefaciens* carregando os vetores binários apropriados, contendo o cDNA do genoma dos vírus (Grimsley et al. 1986; Chiba et al. 2006; Liu et al. 2009; Wang et al. 2009). Um sistema genético baseado na agroinfiltração de plantas de *N. benthamiana* foi desenvolvido em que esta planta atua como hospedeiro intermediário para a multiplicação de vírions CTV para a posterior infecção mecânica em plantas de citros (Gowda et al., 2005; El-Mohtar e Dawson, 2014).

A expressão transiente, comum para vetores virais, propriamente dita caracteriza uma expressão temporária, mas tem sido observada sua manutenção por mais de anos na planta quando mediada por CTV (El-Mohtar E Dawson, 2014). Com base nisso, o emprego de técnicas de biologia molecular para inserção do gene que codifica para cistatinas no vetor viral (CTV-Cistatina) se mostra muito atrativa, visto que o vetor CTV coloniza o floema da planta propiciando a expressão da proteína-alvo neste mesmo vaso e devido o movimento célula-a-célula e de longa distância comuns para vírus (Padgett et al., 1996) o que resulta na infecção sistêmica (Ambrós et al., 2011). Assim, é esperado o alcance da construção “CTV-cistatina” em qualquer porção da planta em que seria distribuído os fotoassimilados, promovendo a superexpressão da proteína de interesse em todo o sistema vascular vegetal (El-Mohtar e Dawson, 2014), favorecendo a captura da cistatina pelo inseto *D. citri* (Figura 11).

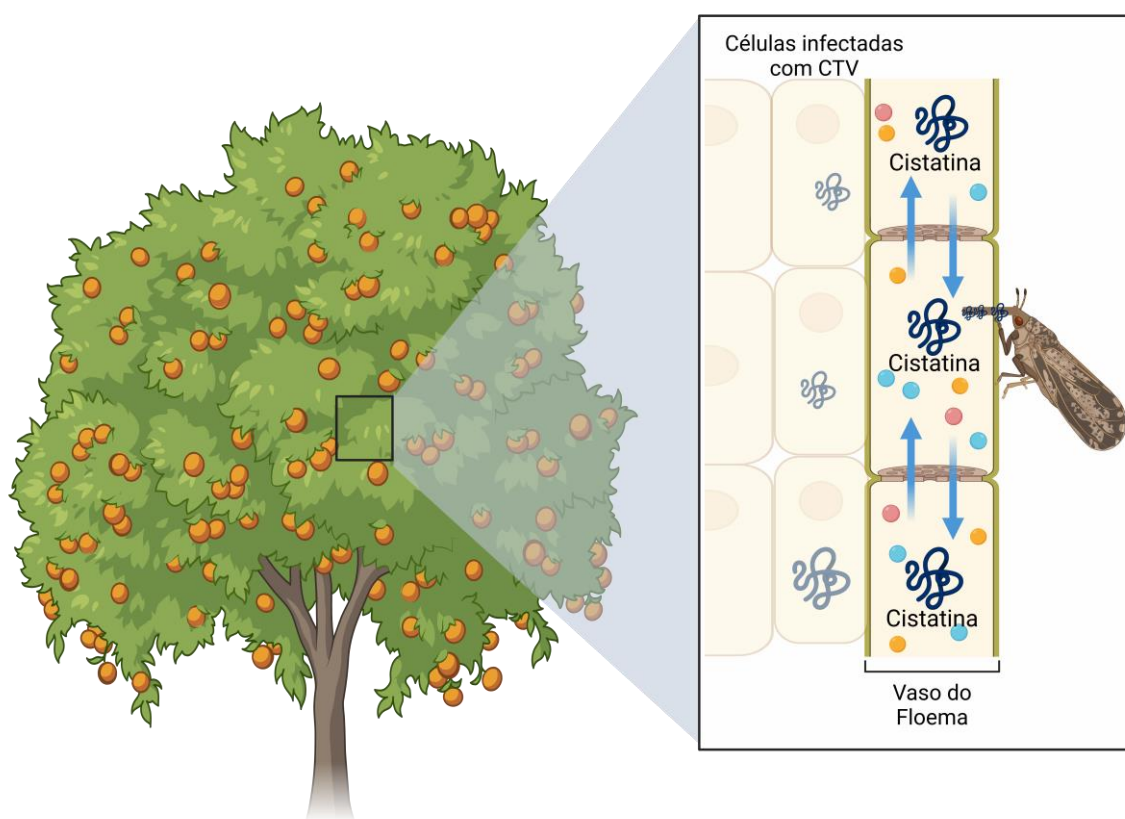


Fig. 11 – Representação esquemática da estratégia de manejo de *D. citri* com utilização do vetor viral CTV para a entrega da cistatina em citros. No esquema é mostrado que após infecção das células vegetais com CTV, há a distribuição de cistatinas no floema da planta, sendo este tecido a mesma região em que o inseto-sugador *D. citri* obtém a seiva elaborada para a sua alimentação. Dessa forma, presume-se que com esse sistema o inseto também adquirirá a cistatina, o inibidor de cisteíno peptidase, destinada ao manejo do psilídeo. Fonte: elaborado pela autora. Criado com BioRender.com.

Assim, é possível inferir com base no comportamento alimentar de *D. citri*, um inseto sugador de seiva, que sua alimentação em plantas de citros contendo a construção CTV-cistatina

possibilita a aquisição da proteína inibidora de cisteíno peptidase (Figura 11), configurando uma potencial estratégia de manejo desse inseto vetor do HLB.

O vetor CTV foi desenvolvido por meio de engenharia genética, partindo de um clone infeccioso de cDNA no Citrus Tristeza Virus (isolado T36 do CTV; número de acesso ao GenBank AY170468) inserido no vetor binário pCAMBIA-1380; sendo dessa forma o plasmídeo base utilizado para as construções desenvolvidas neste trabalho (Satyanarayana et al., 1999; Satyanarayana et al., 2001; Gowda et al., 2005; El-Mohtar e Dawson, 2014). Esse plasmídeo, denominado tipo selvagem, CTV-*wt*, contém o RNA genômico do CTV entre o promotor 35S duplicado do vírus do mosaico da couve-flor na extremidade 5'. Além disso, tal vetor apresenta sítios de restrição exclusivos, *Pac* I e *Stu* I que foram posicionados, de forma relativa, nas extremidades 5' e 3' respectivamente, para permitir a inserção gênica sob o elemento controlador (CE) de RNA da proteína de revestimento CP.

Dessa forma, neste capítulo será abordada a utilização do vetor CTV (CTV316-4) para a superexpressão de cistatinas de citros (CsinCPI-2 e CclemCPI-1) em *Citrus macrophylla*, com intuito de promover uma alternativa para o controle populacional de *D. citri*. O desenvolvimento deste trabalho foi possibilitado devido a gentil anuência quanto ao uso do vetor CTV316-4 através do Dr. Dawson do *Citrus Research and Education Center, University of Florida*, além da colaboração e suporte do Fundecitrus, Araraquara – SP.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse projeto consistiu no desenvolvimento de uma tecnologia para o controle do inseto *Diaphorina citri*, vetor da doença HLB, utilizando como ferramenta o vetor CTV para a superexpressão de cistatinas em citros.

2.1 Objetivos específicos

- Construção dos vetores com base no CTV contendo os genes correspondentes às cistatinas de citros CclemCPI-1 e CsinCPI-2;
- Agroinfiltração das construções CTV em *N. benthamiana*;
- Isolamento dos vírions recombinantes de CTV para inoculação em *C. macrophylla*;
- Produção de *C. macrophylla* superexpressando as cistatinas vegetais mediados pelo CTV;
- Confirmação da presença dos genes de interesse nas plantas *C. macrophylla* inoculadas com o CTV;
- Ensaio biológico entre as plantas *C. macrophylla* + CTV e o psilídeo *Diaphorina citri*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento das cistatinas de citros

A partir da identificação do cDNA que codifica a CsinCPI-2 (Schneider et al., 2020) por meio de análises *in silico*, foi realizada a síntese dos oligonucleotídeos específicos (Tabela 1) para o posterior isolamento da ORF. Realizou-se a extração do RNA total da planta *Citrus sinensis* e isolou-se o RNA mensageiro utilizando o Kit PolyATtract® Systems (Promega), além do cDNA que foi sintetizado utilizando o kit Improm II Reverse Transcription System (Promega). O cDNA foi utilizado como molde em uma reação de amplificação para isolamento da ORF (*Open Reading Frame*) utilizando os oligonucleotídeos específicos para a cistatina CsinCPI-2. O produto de amplificação foi purificado e clonado em vetor de propagação pGEM®-T (Novagen), resultando na construção pGEM®-T_CsinCPI-2. Também, utilizou-se de uma construção previamente realizada por nosso grupo de pesquisa denominada pGEM®-T_CclemCPI-1 para subclonagem em vetor de expressão CTV. Primers específicos (Tabela 1) também foram utilizados para a adição dos sítios de clivagem de *Pac I* e *Stu I* para posterior subclonagem em vetor de expressão.

Tabela 1: Sequência de primers específicos para as cistatinas CclemCPI-1 e CsinCPI-2

Primer	Sequência	Amplicon (pb)
CclemCPI1-F	5' AAT <u>AGGCCT</u> ATGATCGTTTAGTGGGAGGGAGATCAGAGGTGAAGGACGTG3'	341 pb
CclemCPI1-R	5' ACCTTAATTAATCACTCGGAAGGGCAAATTTAAGCATTCTTAGAGTG 3'	
CsinCPI2-F	5' AAT <u>AGGCCT</u> ATGGCTACTGTTGGTGGTGTACGTGAAGTTGAAGCTACTGCT3'	324pb
CsinCPI2-R	5' ACCTTAATTAAGCGGTGCTGGAGTGAGACTGTGCAACGGTGTGAAC 3'	

Sequência de oligonucleotídeos para isolamento da cistatina e adição dos sítios de restrição de *Stu I* (AGGCCT) e *Pac I* (TTAATTAA) sublinhado acima. Fonte: elaborado pela autora.

3.2 Purificação do produto de amplificação e clonagem no vetor viral (T36) CTV316-4

As construções pGEM®-T_CsinCPI-2 e pGEM®-T_CclemCPI-1 foram utilizadas como molde em uma PCR a fim de se obter a amplificação do fragmento correspondente às cistatinas. O produto de amplificação foi analisado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (1 µg/mL) e visualizado sob luz UV.

O produto de amplificação correspondente às cistatinas, bem como o vetor viral destino CTV316-4 foram purificados utilizando Fenol clorofórmio: álcool isoamílico, como se segue: acrescentou-se acetato de sódio (3M, pH 5,2) na proporção de 1/10 do volume inicial do vetor, ou inserto a ser purificado. Acrescentou-se o mesmo volume de Fenol clorofórmio e as amostras foram homogeneizadas em vórtex. Após, centrifugou-se a amostra durante 5 minutos, a 16000 g e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 1 mL de etanol 95% e a amostra foi incubada durante 1h, a -80 °C. Posteriormente, seguiu-se com a centrifugação do material a 16500 g, por 15 min. Descartou-se o sobrenadante, e seguiu-se com o precipitado que foi lavado em etanol 70%, seguido de centrifugação a 16500 g, 15 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco à temperatura ambiente. Foi utilizada água livre de nuclease para eluição do DNA.

De forma independente, 20 µg do inserto correspondente a cistatina e 20 µg do vetor CTV316-4 foram utilizados numa reação de digestão com as enzimas de restrição (*Pac I* e *Stu I* (New England Biolabs) 30U de cada; 5 µL do tampão comercial Cut Smart (10x), 20 µg inserto/vetor; água para um volume final de 50 µL). As reações foram incubadas por cerca de 16h, a 37 °C. O produto de clivagem foi observado em gel de agarose 1% e os fragmentos foram purificados com o kit GeneClean® (MP Biomedicals, Solon, OH, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

Posteriormente, vetor e inserto digeridos foram misturados em um único tubo. Após, seguiu-se para uma reação de ligação (17 µL da mistura inserto + vetor CTV; 2 µL do tampão (10x); 1U T4 DNA ligase (Promega); água suficiente para 20 µL). A reação foi incubada a 4 °C, por cerca de 16h. Após, a enzima foi inativada pela incubação a 65 °C por 10 minutos, seguida de gelo. Precipitou-se a amostra utilizando glicogênio (2 µg/µL) (Invitrogen) (20 µL reação de ligação; 1 µL glicogênio; 2,1 µL de acetato de sódio 3M, pH 5,2; 60 µL de etanol 95%) com incubação a -80 °C, durante 1h. A amostra foi centrifugada a 16000 g, a 4 °C por 20 minutos e o sobrenadante descartado. Posteriormente, o *pellet* foi lavado em etanol 70%, centrifugado a 16000 g, 4°C, 15 min, e com o auxílio de uma pipeta retirou-se o excesso de sobrenadante. Após completa secagem da mistura de DNA, a mesma foi ressuspensa em 6 µL de água ultrapura. A utilização das enzimas *Pac I* e *Stu I* permite a inserção do gene de interesse na região entre CPm e CP do vetor viral, posicionado à porção terminal 3' (Figura 12). O produto desta reação de ligação foi utilizado para a transformação de células de *E. coli* JM109 (Promega) para propagação das construções de interesse.

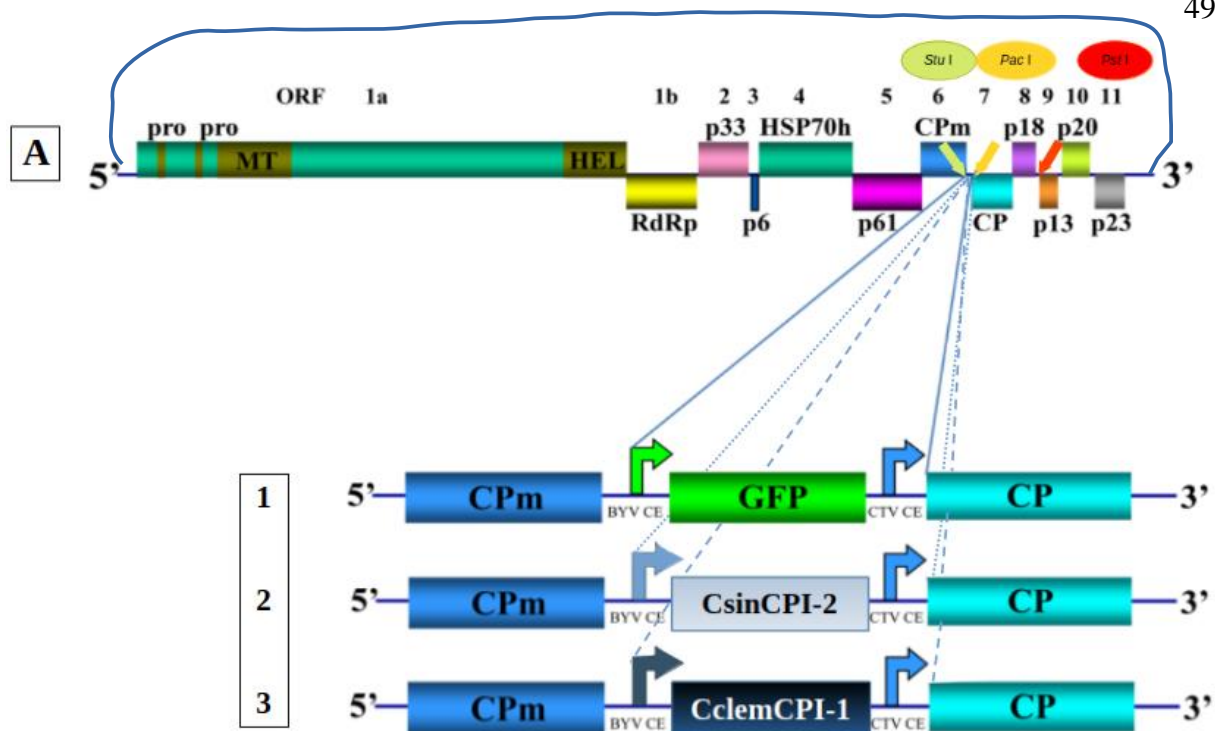


Fig.12- Representação esquemática da estratégia de clonagem em plasmídeo (pCAMBIA-1380) contendo o vetor CTV. A: Organização genômica do CTV com suas 12 ORFs. A estratégia de clonagem abordada usou as enzimas de restrição *Stu* I (elipse verde claro) e *Pac* I (elipse amarela) para clivar os sítios de restrição correspondentes entre CPm e CP (setas verde claro e amarelo). A enzima *Pst* I (elipse vermelha) é utilizada em conjunto com a enzima *Stu* I em uma das fases de checagem da construção. **1:** Visão ampliada da região entre CPm e CP com a inserção do gene correspondente à GFP; sendo que este clone especificamente foi cedido gentilmente pelo Fundecitrus; **2:** Visão ampliada da região entre CPm e CP com a inserção do gene correspondente à CsinCPI-2; **3:** Visão ampliada da região entre CPm e CP com a inserção do gene correspondente à CclemCPI-1. Essa imagem contém uma representação ilustrativa. Vale reforçar que 1, 2 e 3, representam clones diferentes e individuais, cada um contendo o gene-alvo descrito. Além disso, apesar da inserção dos genes-alvo no CTV serem na mesma posição (entre CPm e CP), os plasmídeos utilizados foram diferentes, sendo para a cistatinas o vetor CTV316-4 e para GFP, CTV245. Fonte: Adaptado de Folimonova, 2013.

3.3 Transformação de células bacterianas e isolamento do DNA de interesse

Colônias de *E. coli* (JM109) competentes por CaCl_2 foram transformadas com o DNA previamente preparado (seção 3.2 deste capítulo; Figura 12). Para tanto, 1 μg do DNA (CTV316-4 + cistatina) foi adicionado às células e a mistura incubada durante 30 minutos no gelo. Realizou-se o choque térmico à 42°C , durante 1:30 minutos e, após, a mistura foi colocada no gelo por 2 minutos, seguida da adição de 500 μL do meio 2xYT (Sigma). Após, 100 μL dessa cultura foi plaqueada em placas contendo 2xYT e o antibiótico Canamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e as placas incubadas a 37°C durante 24h. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura ambiente, por no máximo 3 dias até o surgimento das colônias.

As colônias transformantes foram inoculadas em 40 mL de 2xYT líquido contendo Canamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), incubadas por cerca de 16h, a 37°C , sob 150 rpm de agitação. Centrifugou-se as culturas a 8000 g, por 10 minutos a 4°C . O meio de cultura foi descartado e

adicionou-se 3 mL do tampão SET (Sacarose 15 %, 0,10 mM de EDTA 25 mM de Tris-HCL pH 8,0) ao precipitado, com a adição de 2 mg/mL de lisozima. Após a homogeneização, as células, foram incubadas em gelo por 20 minutos. Acrescentou-se 6 mL do tampão de lise (NaOH 0,2M/SDS 1%), seguido de incubação no gelo de 10 minutos. Foi adicionada 3,75 mL de acetato de sódio 3M, pH 5,2. Após homogeneização da mistura, incubou-se novamente no gelo durante 20 minutos, seguido pela centrifugação das amostras à 4°C, por 15 minutos à 16500 g. Os sobrenadantes foram transferidos para novo tubo contendo 20 µL de RNase A (10mg/mL), homogeneizados e incubados à 37 °C por 1 hora. Os lisados celulares foram purificados com 5 mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:1:1, V:V:V) agitando vigorosamente por 15 segundos, em seguida os tubos foram centrifugados por 10 minutos à 16500 g a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos e esse passo repetido mais uma vez. Posteriormente, adicionou-se ao sobrenadante 22 mL de etanol 95% e o DNA foi precipitado pela incubação durante 16h a -80 °C. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 20000 g, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e adicionados 5 mL de etanol 70% gelado, seguido de uma centrifugação de 10 minutos a 20000 g. O etanol foi descartado e o precipitado foi seco à 37 °C. O precipitado de DNA foi ressuscitado em 450 µL de água ultrapura. As amostras foram transferidas para novos tubos preparados com 50 µL de Glass Beads (Sigma) e 1 mL de sepharose (Sephacrose-Amersham). Os tubos contendo sepharose e DNA foram então centrifugados por 1500 g por 3 minutos acoplados a tubos de 1,5 mL para recuperação do DNA. Após a purificação, foi realizada quantificação do DNA no espectrofotômetro Nanodrop 1000 Spectrophotometer V3.8 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, EUA). Foram realizadas análises de restrição independentes com *Stu* I e *Pst* I, *Pac* I e *Stu* I e *Eco* RV, para a confirmação da correta inserção gênica e o perfil de bandas, respectivamente, esperados para confirmar a integridade do vetor CTV.

Além disso, clones pré-selecionados na análise de restrição das construções CTV316-4_CsinCPI-2 e CTV316-4_CclemCPI-1 foram submetidos ao sequenciamento de DNA para a confirmação mais assertiva da inserção correta do gene de interesse. Posteriormente, realizou-se o alinhamento entre as sequências obtidas com o sequenciamento e aquelas presentes no banco de dados (CsinCPI-2, XM_025095413.2; CclemCPI1, XM_006420987.2) através do *software online* MultiAlin (Corpet, 1988).

3.4 Preparação do material vegetal

Plantas de *N. benthamiana* foram mantidas em condições controladas de temperatura (22-24°C), com fotoperíodo de 16/8 horas e 60% umidade. Além disso, mudas de *C. macrophylla* de seis meses também foram mantidas sob condições controladas em câmara de crescimento de plantas, com temperatura de 18-26°C (Ambrós, et. al., 2011), no Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), em Araraquara-SP.

3.5 Transformação em *Agrobacterium tumefaciens*

Células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* (linhagem EHA-105) foram transformadas com 2 µg de DNA do vetor vazio CTV316-4, CTV316-4_CsinCPI-2, CTV_GFP (este cedido gentilmente pelo Fundecitrus) e CTV316-4_CclemCPI-1. Para a transformação, as construções de interesse foram adicionadas às células de *A. tumefaciens* (linhagem EHA 105) e incubadas a 37 °C por 5 minutos, seguido de 5 minutos de incubação no gelo. Adicionou-se 1 mL de meio LB e depois incubou-se a mistura DNA + células a 28 °C, durante 4 h, a 150 rpm de agitação. As células foram precipitadas a 8000 g por 5 minutos, ressuspensas em 200 µL de meio LB e, posteriormente as culturas foram plaqueadas e selecionadas em meio LB contendo os antibióticos Canamicina (50 µg/mL) e rifampicina (50 µg/mL). As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas até o surgimento das colônias transformantes.

3.6 Agroinfiltração em *Nicotiana benthamiana*

As colônias transformantes de *A. tumefaciens* com as construções CTV316-4_CsinCPI-2, CTV316-4_CclemCPI-1 e os controles (T36) CTV316-4 e CTV_GFP foram inoculadas em 5 mL meio 2xYT contendo rifampicina (50 µg/mL) e Canamicina (50 µg/mL) durante 48h. Após, 300 µL dessa cultura foi transferido para 15 mL de meio 2xYT fresco, contendo rifampicina (50 µg/mL) e Canamicina (50 µg/mL), MES 10 mM, pH 5,8 e Acetoseríngona (20 µM). As culturas foram incubadas a 28 °C, sob agitação, por aproximadamente 16h. Centrifugou-se as culturas a 2370 g, a temperatura ambiente, durante 15 minutos. O precipitado foi ressuspensado em 10 mL de tampão (10mM MES pH 5,85, 10 mM MgCl₂). A cultura foi centrifugada a 2370 g, 15 minutos, a temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensado em 10 mL de tampão (10 mM MES pH 5,85, 10 mM MgCl₂ e 150 µM de Acetoseríngona). A densidade óptica foi medida (DO_{600nm}) e mais tampão foi adicionado para o ajuste da DO = 1,0. As células foram mantidas a 23°C, no escuro, durante o período de aproximadamente 16 h antes da infiltração nas folhas (Gowda et al., 2005). De igual modo, A.

tumefaciens transformadas com plasmídeos contendo os genes virais supressores de silenciamento (p19, p24, HcPro, p22) foram preparados como descrito acima e após o ajuste da DO, as células contendo os supressores foram misturadas, originando o mix de supressores de silenciamento (MSS). Após a incubação, às culturas contendo os clones de interesse foram adicionadas o MSS, na proporção de 20% do volume inicial de tais culturas (Ambrós et al., 2011; Ambrós et al., 2013).

As plantas utilizadas na agroinfiltração foram mantidas úmidas a 23°C, sob condições de luminosidade branda (1000 lux), Umidade Relativa (UR) de 50-60%, com um fotoperíodo de 16h/8h de luz e escuro respectivamente (Ambrós et al., 2011; El-Mohtar e Dawson, 2014; Gowda et al., 2005). Foram agroinfiltradas (Figura 13) pelo menos cinco plantas de *N. benthamiana* para cada construção, sendo que este processo se deu pela injeção manual da suspensão celular de *A. tumefaciens* contendo as construções de interesse + MSS, na porção abaxial de todas as folhas da planta, até que toda a área foliar estivesse coberta com a suspensão celular (todas as folhas da planta ao final, caracteristicamente, se mostravam “úmidas” devido a injeção da suspensão), com o auxílio de uma seringa de 1mL (Figura 13).

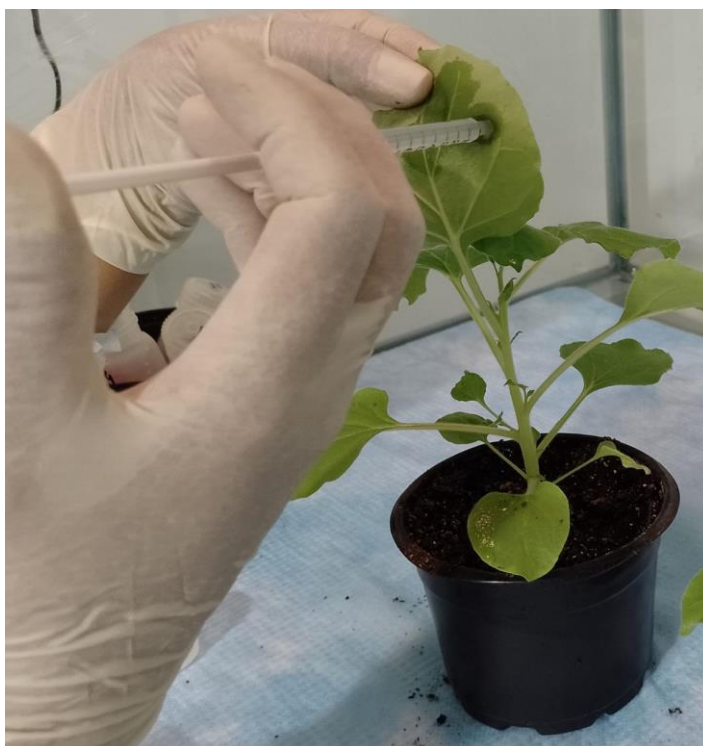


Fig. 13 – Foto do processo de agroinfiltração da suspensão celular de *A. tumefaciens* transformadas com as construções CTV316-4_CSinCPI-2, CTV33-23_GFP, CTV316-4_CclemCPI-1 e o vetor CTV_316-4, em *N. benthamiana*. Infiltração da suspensão celular na porção abaxial da folha de *N. benthamiana* com o auxílio de uma seringa. Fonte: elaborado pela autora.

3.7 Ensaio ELISA composto de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas e *Citrus macrophylla* para detecção de CTV

Um ensaio de ELISA foi realizado após 7 dias da agroinfiltração em plantas a fim de verificar a replicação inicial do vírus. Após 6-8 semanas, esse processo foi repetido para verificar o aumento da titulação viral para confirmar a infecção sistêmica. Foram utilizadas plantas inoculadas com a construção CTV_GFP, como controle positivo e plantas livres de vírus inoculadas apenas com solução tampão (*buffer*) e com os supressores de silenciamento (MSS), como controles negativos. Foram utilizados 0,3 g de nervuras das folhas de *N. benthamiana* (ou citros), que foram trituradas em 3 mL de tampão PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,2). Placas de 96 poços foram incubadas com o anticorpo primário anti-CTV diluído (1/500 para as análises de *N. benthamiana* e 1/200 para análises de citros) em tampão carbonato bicarbonato 0,1M pH 9,6. Após incubação de 16 horas a 4 °C, a microplaca foi lavada seis vezes com tampão PBST 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, Tween 0,05%, pH 7,2). 100 µL do extrato vegetal foram aplicados em cada poço da placa, que foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, lavou-se a placa cinco vezes com PBST 1X e o segundo anticorpo e o conjugado diluídos foi adicionado nas mesmas condições do primeiro anticorpo, seguida por 2 h de incubação à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi lavada cinco vezes com PBST 1X e adicionado o substrato pNPP (para- nitrofenilfosfato) dissolvido em tampão PNP 1X (10mM Dietanolamina, 0,5 M MgCl₂, pH 9,8) na concentração de 1mg/mL. Incubou-se a placa durante 1 hora para o completo desenvolvimento de cor nas amostras reativas. A leitura da coloração foi realizada em espectrofotômetro (Microplate Reader Thermo Multiskan Ascent 96) a 405 nm. Os resultados positivos foram determinados quando os valores de leitura eram três vezes maiores do que a média dos valores das amostras de controle negativas, ou seja, aquelas livres de CTV, como sugerido pelo fabricante (Agdia).

3.8 Isolamento dos vírions de CTV

Baseado em Robertson e colaboradores (2005), 10 g de folhas de *N. benthamiana* exibindo os sintomas característicos somados ao resultado positivo do teste de ELISA, de cada construção, foram coletadas após cerca de 45 dias desde a agroinfiltração. O tecido vegetal foi triturado em 25 mL de tampão (KPO₄ 40 mM, sacarose 5% e 10 µL de DTT 1M) até obter-se um extrato líquido (Figura 14A). A fase líquida foi separada dos debrís celulares após filtração em tecido Miracloth e centrifugação (10 minutos, 4°C, 16000g) (Figura 14B). Em tubos

apropriados para Ultracentrífuga Beckman, foram adicionadas 11 mL do sobrenadante e 1 mL de sacarose 70% foi adicionada no fundo do tubo (Figura 14C) e a mistura foi centrifugada a 26600 g a 4°C durante 100 minutos. A solução de sacarose contendo os vírions (Figura 14D) foi drenada com a ajuda de uma agulha de dissecação (Figura 14E) e por gotejamento a primeira fração de 500 µL foi recolhida e descartada. A segunda fração de 500 µL drenada foi recolhida e utilizada para inoculação em citros.

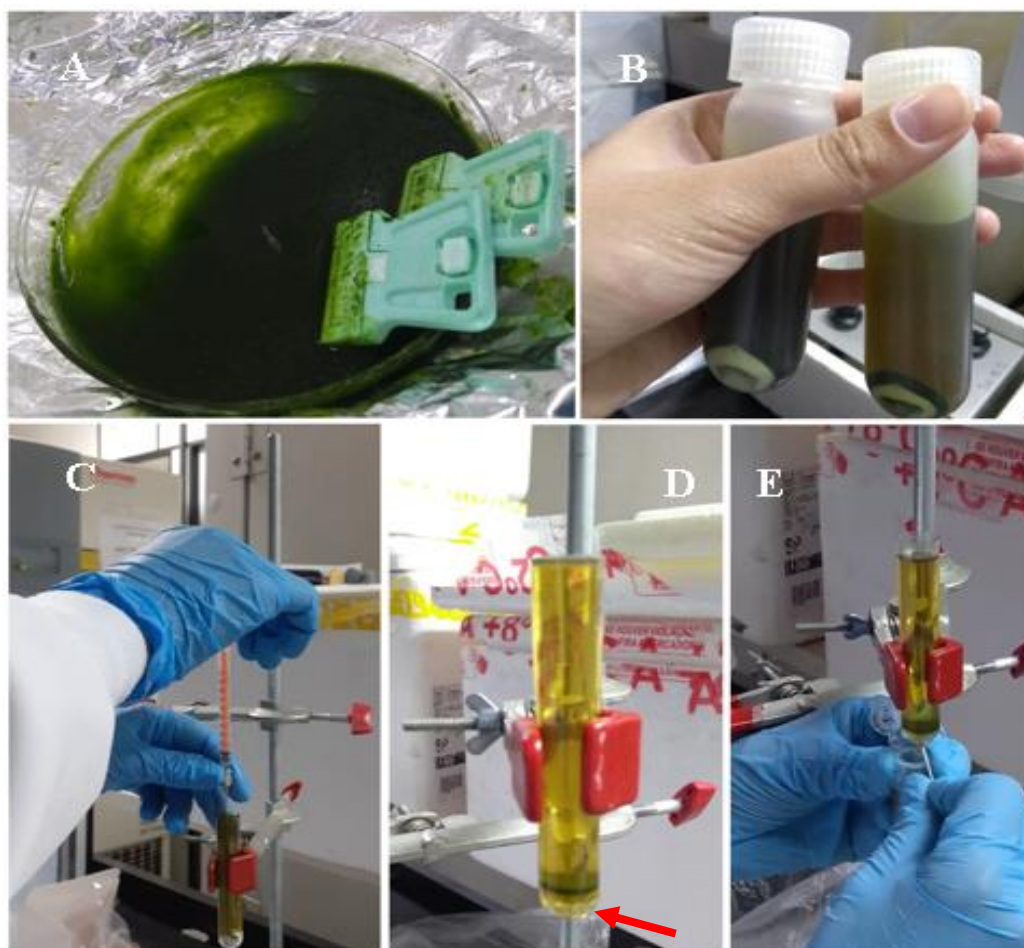


Fig. 14 – Folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com suspensões celulares de *A. tumefaciens* contendo construções de interesse (CTV316-4_CSinCPI-2, CTV316-4_CelemCPI-1 e CTV316-4), foram utilizadas no processo de purificação dos vírions de CTV. A: 15 mg de folhas sintomáticas de *N. benthamiana* foram congeladas em N₂ líquido, maceradas e homogeneizadas com tampão de extração; lâminas foram utilizadas para produzir um extrato vegetal mais líquido e homogêneo **B:** Centrifugação do extrato vegetal para separação da fase líquida e dos debris celulares; **C:** Adição da fase líquida obtida do extrato vegetal e, com o auxílio de uma seringa, adiciona-se sacarose 70%; **D:** tubo contendo o extrato vegetal de *N. benthamiana* portando os vírions + sacarose 70% após ultracentrifugação (a seta vermelha aponta para a solução de sacarose 70% contendo as partículas virais, pós centrifugação); **E:** Fundo do tubo sendo furado com uma agulha para drenagem da solução de sacarose contendo os vírions puros em um microtubo plástico. Fonte: elaborado pela autora.

3.9 Inoculação mecânica (*Bark-flap*) dos vírions recombinantes em citros

Cerca de 10 disseções de aproximadamente 4 cm foram feitas ao longo do caule de *C. macrophylla* com o auxílio de um bisturi (Figura 15A), tendo sido utilizado uma média de

cinco plantas para cada construção. Essa abertura na casca foi realizada no formato de “U” invertido sem a remoção completa da casca, apenas permitindo a exposição do córtex caulinar (Figura 15A). Posteriormente, 20 μ L do purificado viral obtido anteriormente (descrito na seção 3.8 deste capítulo) foi gotejado com uma pipeta (Figura 15B) nessa porção aberta do caule. Após, a casca foi reposicionada e firmada com fitilhos propiciando a cicatrização do tecido (Figura 15C, D).

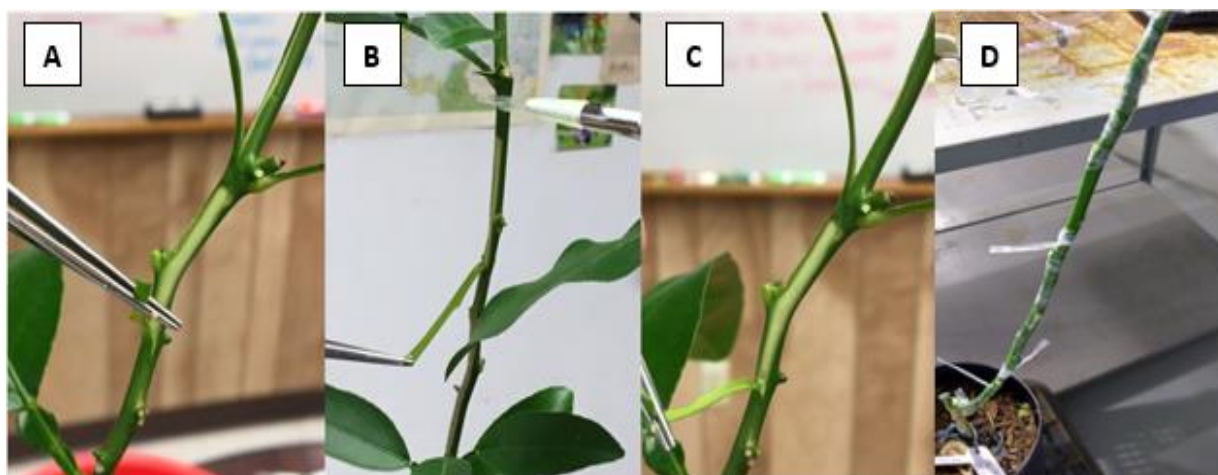


Fig. 15- Inoculação mecânica (*Bark-flap*) da suspensão de vírions em *C. macrophylla*. **A:** É possível ver a dissecação retangular realizada na casca da planta expondo o córtex caulinar; **B:** Com uma pipeta, a suspensão contendo os vírions é gotejada no córtex caulinar da planta cítrica; **C:** É possível visualizar entre a casca seccionada e o córtex a solução de vírions que foi recém-adicionada; **D:** Casca já reposicionada cobrindo o córtex caulinar antes exposto, e envolto com parafilme para permitir a adequada cicatrização da planta e, posteriormente, evolução da infecção viral. Fonte: elaborado pela autora.

Após esse procedimento, as plantas foram transferidas para casa de vegetação com condições controladas de desenvolvimento. Foi realizado um ensaio de ELISA após cerca de dois meses para confirmar o sucesso da infecção viral na planta. O procedimento foi realizado conforme as instruções do fabricante, como citado acima no item 3.7.

Plantas de *C. macrophylla* positivas no ELISA de cada construção foram utilizadas para propagação do CTV recombinante alvo em novas plantas por enxertia. Dessa forma, gemas foram introduzidas em um porta-enxerto de limão cravo, especificamente em abertura no caule da planta em formato de “T” invertido. Assim, a gema foi posicionada na abertura e, posteriormente, presa com fitilhos para a correta cicatrização (Figura 16). Pouco mais de 20 dias depois as plantas foram podadas para indução do fluxo vegetativo na planta. As plantas foram mantidas sob condições controladas em casa de vegetação no Fundecitrus. Após seis meses as plantas receptoras do vírus recombinante foram testadas por ELISA. Àquelas com resultado negativo de replicação do CTV foram reenxertadas. Após mais seis meses foram

novamente testadas. O propósito dessa técnica é propagar o CTV em citros, aumentando o número de plantas disponíveis para cada construção a ser estudada.

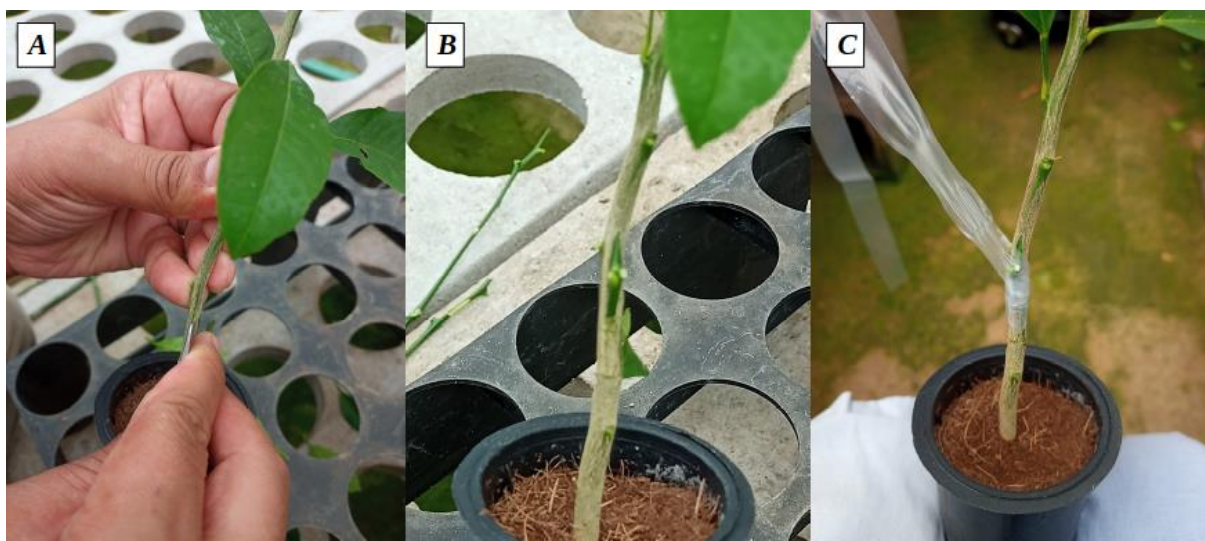


Fig. 16- Propagação do CTV recombinante em limão cravo através da transferência de borbulhas. A: Corte no caule da planta de limão cravo com lâmina; **B:** Gema de *C. macrophylla* contendo o CTV na abertura do caule; **C:** Amarração com fitilho permitindo a cicatrização da planta. Fonte: elaborado pela autora.

3.10 Confirmação da manutenção dos genes de interesse nas plantas transformadas com CTV

Realizou-se a extração do RNA total de folhas jovens de *Citrus macrophylla* dos respectivos tratamentos: *C. macrophylla* livres de vírus, *C. macrophylla* + CTV316-4, *C. macrophylla* + CTV316-4_CclemCPI-1, *C. macrophylla* + CTV316-4_CsinCPI-2 e *C. macrophylla* + CTV-GFP. Para o isolamento do RNA, partiu-se dos tecidos congelados em N₂ líquido que foi macerado no TissueLyser (3x 30 segundos, 30 hertz). Adicionou-se 1 mL de Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen) e a amostra foi adicionada, seguida da adição de 200 µL de clorofórmio, que foi homogeneizada em vórtex e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas a 12000 g, por 20 minutos, a 4 °C. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e foi adicionado 700 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após homogeneização, a amostra a mesma foi centrifugada a 4°C, 12000 g, 30 minutos. O processo foi repetido. O sobrenadante foi transferido e adicionou-se isopropanol gelado para precipitar o RNA. As amostras foram incubadas no -80 °C, por 20 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas a 4°C, por 30 minutos, a 12000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70% e a amostra centrifugada a 7500 g, por 5 minutos, a 4°C; a lavagem foi repetida 2x. O precipitado secou a temperatura ambiente e o RNA foi ressuscitado em 100 µL de água livre de nuclease.

O RNA isolado foi utilizado para sintetizar o cDNA de acordo com o kit Super Script IV (Thermo Fisher Scientific). O cDNA foi utilizado como molde em uma reação de amplificação (10 µL do Tampão HF 5x; 1 µL dNTP 10 mM; 0,15 µL dos Primer CPm-F e CP-R; 1 µL do cDNA; 0,5 µL Taq Phusion; água ultrapura suficiente para 50 µL; ciclo: 98°C – 2 minutos, [40 ciclos a 98°C-30 segundos; 60°C-15segundos; 72°C-40 segundos]; 72°C-5 minutos; 4°C) para confirmar a presença ou ausência dos genes correspondentes às cistatinas ou GFP, utilizando os oligonucleotídeos específicos que hibridizam nos genes correspondentes às proteínas CPm e CP do vetor CTV (Tabela 2). O produto de amplificação foi analisado em gel de agarose 1%.

Tabela 2: Sequência de primers para CPm e CP do vírus CTV

Primer	Sequência
CPm-F	5' AGCTTCTTAACCTACGCGATTTGGGTAAGTACTTGTA 3'
CP-R	5' TCGATGTGTGTAAGTTTACGGAAGTAAAGAAGACTCG 3'

Primers usados no processo de confirmação das construções presentes nas plantas de *C. macrophylla* transformadas com CTV. Fonte: elaborado pela autora.

3.11 Ensaio biológico entre *D. citri* e plantas de citros contendo CTV

Um ensaio biológico contra *D. citri* foi realizado em plantas de *C. macrophylla*, contendo cinco tratamentos, sendo eles: *C. macrophylla* livre de vírus, *C. macrophylla* + CTV316-4, *C. macrophylla* + CTVGFP, *C. macrophylla* + CTVCsinCPI-2 e *C. macrophylla* + CTVCclemCPI-1. Dez plantas de cada tratamento foram podadas cerca de 15 dias antes do ensaio e mantidas em condições climáticas semelhantes às da colônia de insetos. Duas fêmeas acasaladas com 10 a 15 dias de idade foram confinadas num único broto (1,5-2 cm de comprimento) de cada planta com uma gaiola de tule durante 4 horas. O número de ovos por broto foi contado 3 dias após a oviposição de *D. citri*. As plantas com 20 ± 10 ovos por broto (10 plantas por grupo), foram selecionadas para seguir o desenvolvimento das ninfas num desenho completamente aleatório. O número de ninfas e ovos inviáveis foi contado 7 dias após a oviposição. Posteriormente, foi utilizada uma gaiola metálica com uma tela de tule no broto de cada planta até a emergência dos adultos. A emergência dos adultos foi observada diariamente que também foram avaliados quanto a deformações morfológicas (Eduardo et al., 2022).

3. 12 Análise estatística

A análise da diferença entre o número/viabilidade de ovos e ninfas de *D. citri* inoculados em *C. macrophylla* (tratamentos: CTV-CclemCPI-1, CTV-CsinCPI-2, CTV-GFP; controles: CTV316-4 e planta livre de vírus), foi determinada usando a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. As suposições de normalidade de cada amostra foram verificadas antes da realização da ANOVA com o teste de Shapiro-Wilk, sendo todas as análises realizadas no RStudio (v. 2023.6.2.561).

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento das cistatinas de citros e purificação

A construção pGEM®-T_CsinCPI-2 obtida foi utilizada na reação de amplificação e, como esperado, a visualização do fragmento de 303 pb correspondente ao tamanho esperado da cistatina CsinCPI-2 foi possibilitada (figura 17). Iniciando-se a partir de uma construção gênica denominada pGEM-T_CclemCPI-1, previamente realizada em nosso laboratório, com *primers* específicos realizou-se uma reação de amplificação desta sequência (Figura 18) adicionando os sítios específicos para posterior clonagem da cistatina CclemCPI-1 em vetor de expressão CTV316-4.

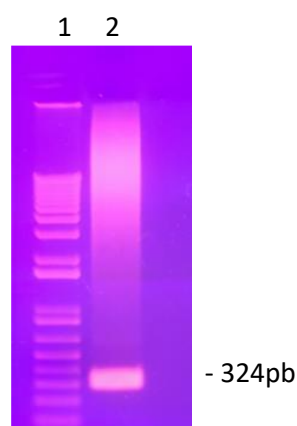


Fig. 17 - Visualização do amplicon correspondente ao gene que codifica para a cistatina de citros CsinCPI-2 em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo. 1: Marcador de DNA 1 Kb; **2:** fragmento de 324 pb correspondente a cistatina CsinCPI-2. Fonte: elaborado pela autora.

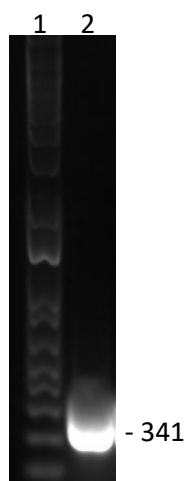


Fig. 18 – Visualização do amplicon correspondente ao gene que codifica para a cistatina de citros CclemCPI-1 em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo. 1: Marcador de DNA 1 kb; **2:** fragmento de 341pb correspondente a cistatina CclemCPI-1. Fonte: elaborado pela autora.

4.2 Confirmação das construções moleculares obtidas com o vetor viral T36 CTV316-4

Ensaio de restrição com as enzimas *Pst* I e *Stu* I, que clivam em porções que liberam os fragmentos de CP e P18 no caso do vetor vazio (Figura 12), resultou num fragmento de 1.142 pb, enquanto um acréscimo no tamanho do fragmento é esperado quando este tem a inserção de um gene exógeno bem sucedida (Figura 19).

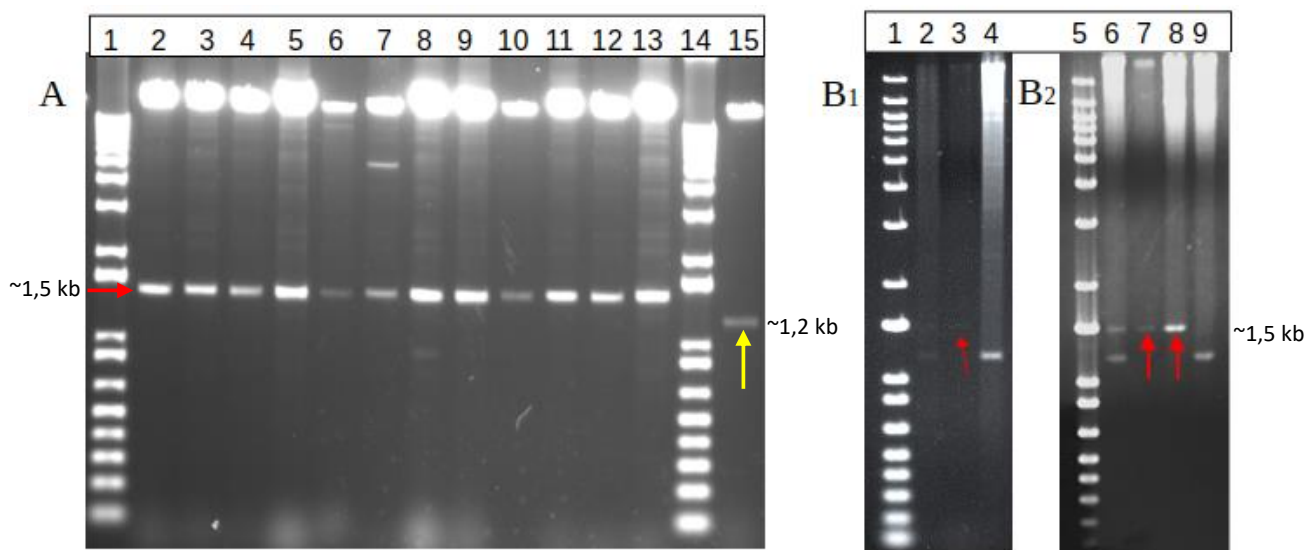


Fig. 19 - Análise de restrição das construções CTV316-4_Cistatina com as enzimas de restrição *Pst* I e *Stu* I. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A: Análise de restrição para a construção CTV316-4_CsinCPI-2. 1: 1Kb DNA ladder; 2 a 13: 35S CTV316-4-CsinCPI-2, clones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, respectivamente; 14: 1 kb DNA ladder; 15: vetor 35S CTV 316-4 vazio, usado como controle. B1 E B2: Análise de restrição para a construção CTV316-4_CclemCPI-1. 1: 1Kb DNA ladder; 2 a 4: 35S CTV 316-4-CclemCPI-1, clones 1, 2 e 3; 5: 1 kb DNA ladder; 6 a 9: 35 S CTV 316-4-CclemCPI-1, clones 4, 5,6 e 7. As setas vermelhas indicam a presença de um fragmento contendo a inserção das cistatinas CsinCPI-2 (quadro A) e CclemCPI-1 (quadro B) no vetor viral CTV316-4. Visualizado com um fragmento de ~1,5 kb. A seta amarela indica a liberação do fragmento de CP e P18 do vetor CTV316-4 ausente de inserto; fragmento de ~1,2 kb. Fonte: elaborado pela autora.

Como pode ser visualizado, quando a clivagem é realizada para o plasmídeo vazio (Figura 19A, coluna 15) temos a liberação de um fragmento de aproximadamente 1.150 pb que corresponde a liberação dos fragmentos CP e P18 (Figura 12). Quando há a inserção correta das cistatinas-alvo, tem-se uma banda com aproximadamente 1500 pb, que se deve a soma das regiões que correspondem à CP, P18 com o acréscimo da cistatina ($1142 \text{ pb} + 324 \text{ pb} = 1466 \text{ pb}$ para a construção com CsinCPI-2, e $1142 \text{ pb} + 341 \text{ pb} = 1483 \text{ pb}$ para a construção com CclemCPI-1) (Figura 19B), nos permitindo assim confirmar a inserção correta dos genes-alvos em alguns clones. No quadro A da figura 19 é possível visualizar a liberação dos fragmentos que correspondem à inserção da cistatina CsinCPI-2, com aproximadamente 1,5 kb. No quadro

B da figura 19, é possível visualizar também fragmentos de aproximadamente 1,5 kb indicando a inserção da cistatina CclemCPI-1.

Além disso, realizou-se a digestão utilizando a enzima *Eco* RV que resultou na clivagem em múltiplos sítios ao longo do plasmídeo, apresentando um perfil padrão de 8-9 bandas visíveis em gel de agarose 1%. Apesar de ser possível visualizar 8 bandas, o padrão teórico é de 11 fragmentos (Figura 20).

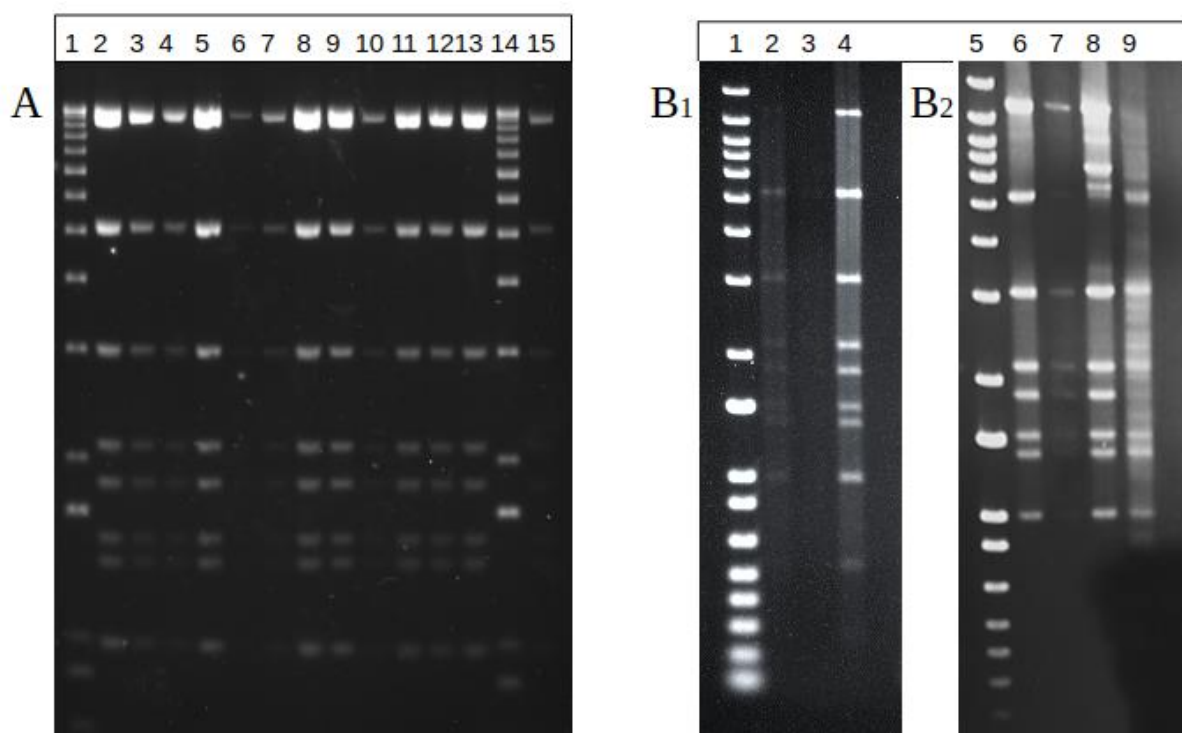


Fig. 20- Visualização das reações de clivagem apresentada de forma esquemática para a confirmação do perfil de bandas esperado para o CTV316-4, clivados com a enzima *Eco* RV. Visualização em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A: Análise de restrição para a construção CTV316-4_CsinCPI-2. 1: 1Kb DNA ladder; 2 a 13: 35S CTV316-4-CsinCPI-2, clones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, respectivamente; 14: 1 kb DNA ladder; 15: vetor 35S CTV 316-4 vazio, usado como controle. B1 E B2: Análise de restrição para a construção CTV316-4_CclemCPI-1. 1: 1Kb DNA ladder; 2 a 4: 35S CTV 316-4-CclemCPI-1, clones 1, 2 e 3; 5: 1 kb DNA ladder; 6 a 9: 35 S CTV 316-4-CclemCPI-1, clones 4, 5,6 e 7. É possível visualizar 8-9 bandas no gel, que resultam da clivagem em diversos pontos do vetor viral CTV316-4 pela enzima *Eco* RV. Fonte: elaborado pela autora.

É possível visualizar no quadro A da figura 20 o padrão esperado que confirma a integridade do vetor viral baseado no perfil de fragmentos após clivagem com *Eco* RV, para a construção CTV316-4-CsinCPI-2. A mesma análise de restrição realizada para a construção CTV316-4-CclemCPI-1, mostrou o perfil de bandas correto apenas para os clones 1, 3, 4 e 5 (Figura 20B).

Além desta confirmação, utilizou-se também das enzimas de restrição *Pac* I e *Stu* I para verificar a liberação do inserto que corresponde à CsinCPI-2 (Figura 21).

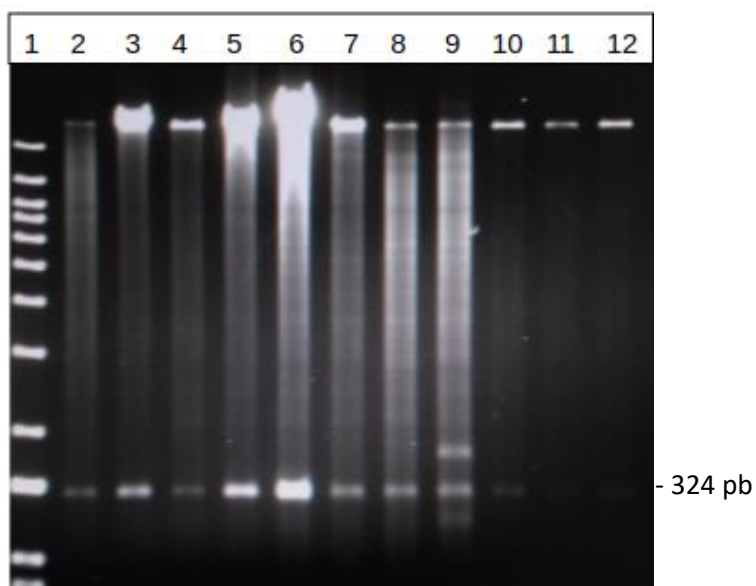


Fig. 21- Análise de restrição das construções 35S CTV 316-4-CsinCPI-2 com a enzima de restrição *Pac I* e *Stu I*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1: 1Kb DNA ladder; 2 a 12: 35S CTV 316-4- CsinCPI-2, clones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11. Observou-se a liberação de um fragmento de 324 pb correspondente à cistatina CsinCPI-2. Fonte: elaborado pela autora.

O vetor viral vazio, CTV316-4 também foi analisado por restrição com a enzima *Eco RV*, onde foi possível observar o perfil de fragmentos esperados para o vetor CTV (Figura 22).

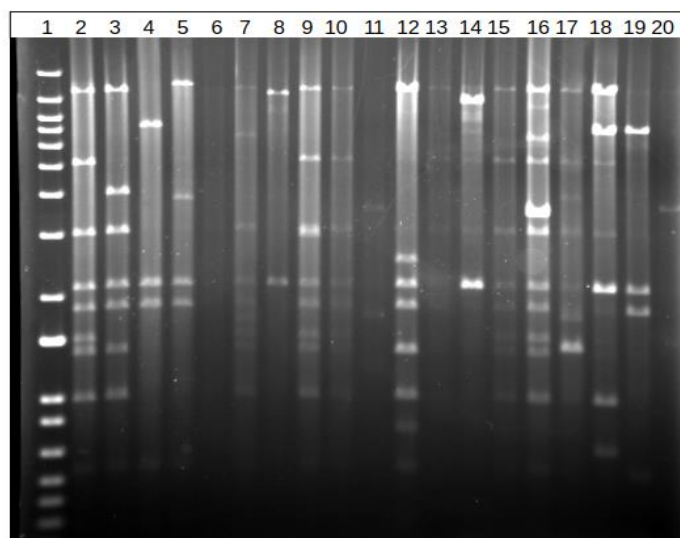
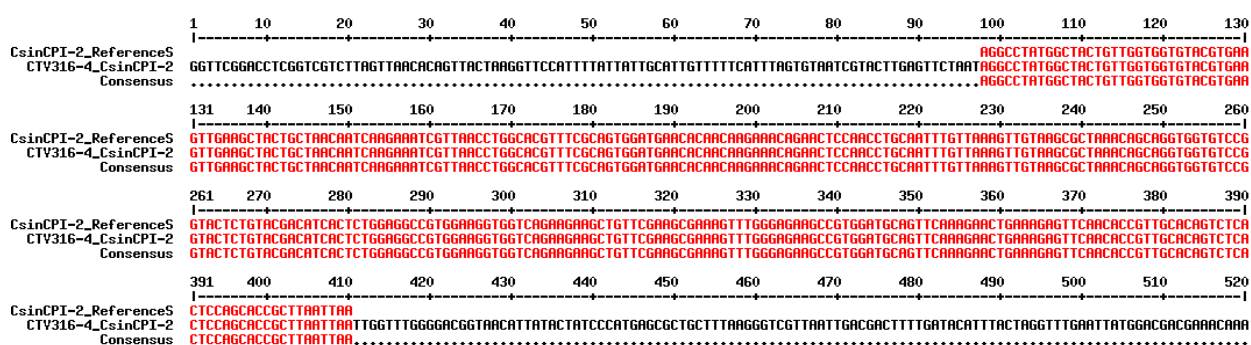
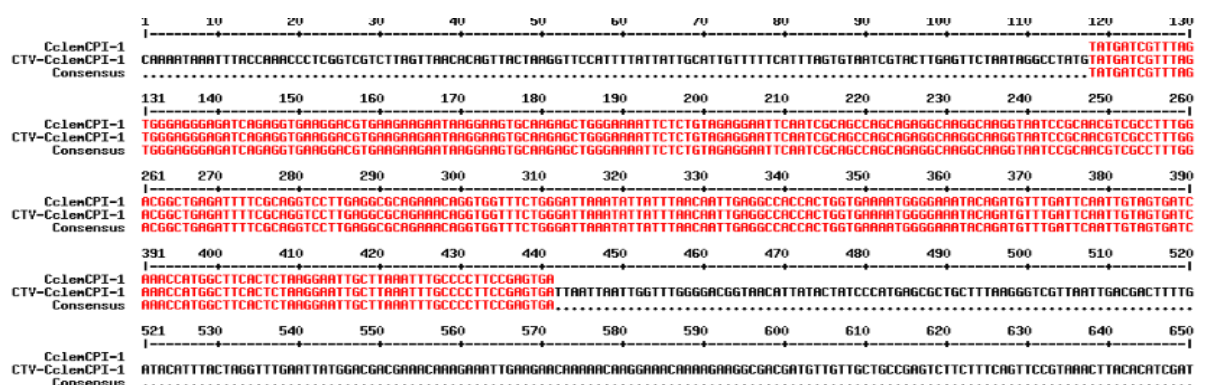


Fig. 22 – Análise de restrição de clones do plasmídeo vazio (T36) CTV316-4 após restrição com a enzima *Eco RV* visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1: DNA ladder 1 kb; 2 a 20: vetor 35S CTV 316-4, clones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19. Fonte: elaborado pela autora.

Considerando o vetor vazio, observou-se o padrão correto de bandas pós-clivagem com *Eco RV* para os clones 1, 8 e 9.

Após a triagem realizada por meio das reações de clivagem, os clones de CT316-4_CsinCPI-2 (clone 9) e CT316-4_CclemCPI-1 (clone 5) selecionados foram submetidos a sequenciamento utilizando *primers* que hibridizam nas sequências codantes das proteínas que montam o capsídeo viral CPm e CP (Tabela 2), para a confirmação da inserção correta do gene de interesse. O resultado do sequenciamento foi alinhado com a sequência de referência de CsinCPI-2 ou CclemCPI-1 no *software online* MultAlin (Corpet, 1988) para confirmar a ausência de mutações e integridade da construção (Figura 23, 24). Além disso, o vetor vazio CTV316-4 também foi avaliado pela clivagem com *Eco* RV (Figura 22), e os clones 8 e 9 foram selecionados para as etapas futuras.



Dessa forma, após confirmar a integridade dos clones selecionados (clone 9, 35S CTV316-4-CsinCPI-2; clone 5, 35S CTV316-4-CclemCPI-1; clones 8 e 9 35S CTV316-4

plasmídeo vazio), além do plasmídeo CTV contendo o gene que codifica para a GFP, células de *A. tumefaciens* foram transformadas e utilizadas para o preparo de suspensões celulares contendo as construções virais de forma independente para cada gene-alvo, para posterior inoculação em *N. benthamiana*. As plantas inoculadas foram submetidas a um ensaio ELISA 7 dias posterior à inoculação (d.p.i), que confirmou a replicação inicial do CTV nas plantas. Após 6-8 semanas desde a agroinfiltração um novo teste de ELISA foi realizado e confirmou-se a alta titulação viral, além disso as plantas apresentaram os sintomas característicos da infecção pelo CTV, como clareamento/amarelecimento das nervuras foliares, enrolamento das folhas e redução do espaço entre os nós apicais (Figura 25).

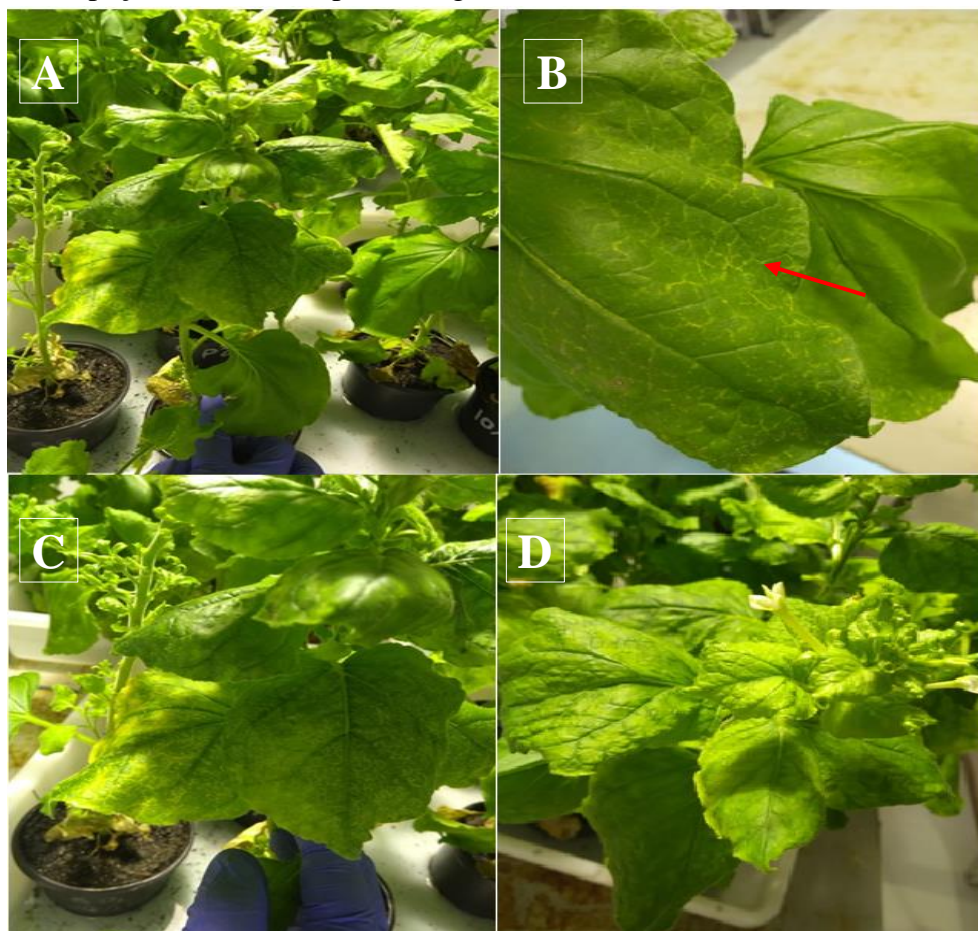


Fig. 25 - Sintomas de infecção sistêmica mediadas por CTV visíveis em *N. benthamiana* (Ambrós et al., 2011) após cerca de 60 d.p.i da suspensão de *A. tumefaciens* transformadas com as construções T36 CTV316-4, CTV316-4_CsinCPI-2 e CTV316-4_CclemCPI-1. A: Amarelecimento das folhas, clorose. **B:** Clareamento das nervuras foliares; mosqueado característico na infecção por CTV (seta vermelha); **C:** Visualização da clorose foliar, além do mosqueado característico; **D:** início do enrolamento das folhas apicais de *N. benthamiana* infectadas; aumento da quantidade de folhas na porção apical. Fonte: elaborado pela autora.

Plantas de *N. benthamiana* inoculadas com a suspensão bacteriana transformadas com a construção CTV33-23_GFP foram utilizadas como controle positivo para visualização da infecção sistêmica por CTV, sendo possível visualizar o espalhamento do CTV por todo o

sistema vascular da planta (Ambrós et al., 2011; El-Mohtar e Dawson, 2014). Além da visualização à olho nu dos sintomas característicos provocados pela multiplicação do vírus na planta (Figura 26A), com o auxílio de luz ultravioleta (UV) é possível visualizar a fluorescência emitida, resultante da expressão da proteína GFP, proveniente da construção contendo o gene que codifica para a GFP em vetor CTV presente em maior parte da planta (Figura 26B). Apesar da agroinfiltração se dar na parte abaxial das folhas é possível visualizar o espalhamento do CTV (Figura 26B, C e D), dado o movimento célula-a-célula e de longa distância (Padgett et al., 1996; Ambrós et al., 2011; El-Mohtar e Dawson, 2014), após o estabelecimento da infecção sistêmica por CTV na planta *N. benthamiana*.

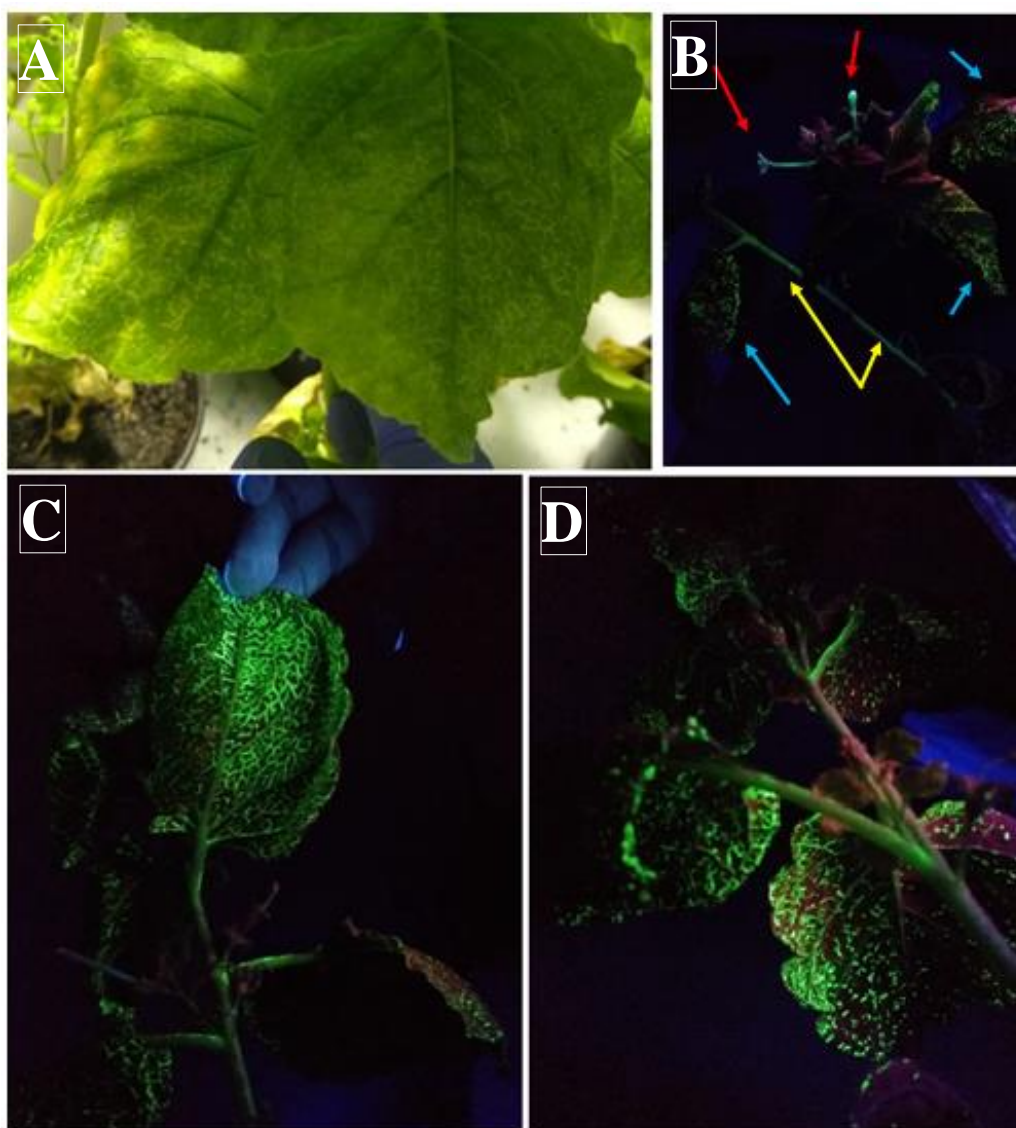


Fig. 26- Plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com a construção CTV33-23_GFP, utilizada como controle positivo do experimento. A: Sintomas característicos da infecção por CTV vistos à olho nu, com o mosqueado amarelado aparente nas nervuras foliares. **B, C e D:** observação das plantas de *N. benthamiana* contendo a construção CTVGFP sob luz UV. As setas indicam a presença da infecção sistêmica presente em diversas porções da planta; nas flores de *N. benthamiana* (setas vermelhas), nas folhas (setas azuis) e no caule (seta amarela). Fonte: elaborado pela autora.

4.3 Ensaio ELISA de *N. benthamiana* agroinfiltradas

Dessa forma, considerando o ensaio de ELISA, os resultados apresentaram altos títulos de CTV ($DO_{405nm} > 3,5$) nas plantas de *N. benthamiana* previamente infectadas (Gowda et al., 2005; Robertson et al., 2005) com as construções CTV316-4_CsinCPI-2, CTV316-4_CclemCPI-1 e o vetor viral vazio CTV316-4 (controle). Baseado em Gowda e colaboradores (2005), culturas em que a densidade ótica ultrapassam o valor de 3,5 em leitura com comprimento de onda de 405 nm apresentam um alto título de CTV e podem ser destinadas a purificação dos vírions, indicando o sucesso da multiplicação viral na planta hospedeira intermediária. Dessa forma, esquematicamente foi elaborado um gráfico contendo um valor de corte (*Cut off*) usado para triar as plantas positivas, quanto a presença do CTV (Figura 27). Esse valor de corte é calculado de acordo com as instruções do fabricante (Agdia®; Elkhart, Indiana, USA), e se dá pela média dos valores de absorbância obtidos para as plantas saudáveis (controle negativo), somados a 3x o valor do desvio padrão. Vale ressaltar que para este teste ELISA utilizou-se como controle positivo amostras vegetais pertencentes ao Fundecitrus, sabidamente positivas quanto a presença do CTV. Como controles negativo, utilizou-se plantas não inoculadas, isto é, saudáveis e livres de vírus, inoculadas com *buffer*, ou supressores (MSS) (Figura 27).

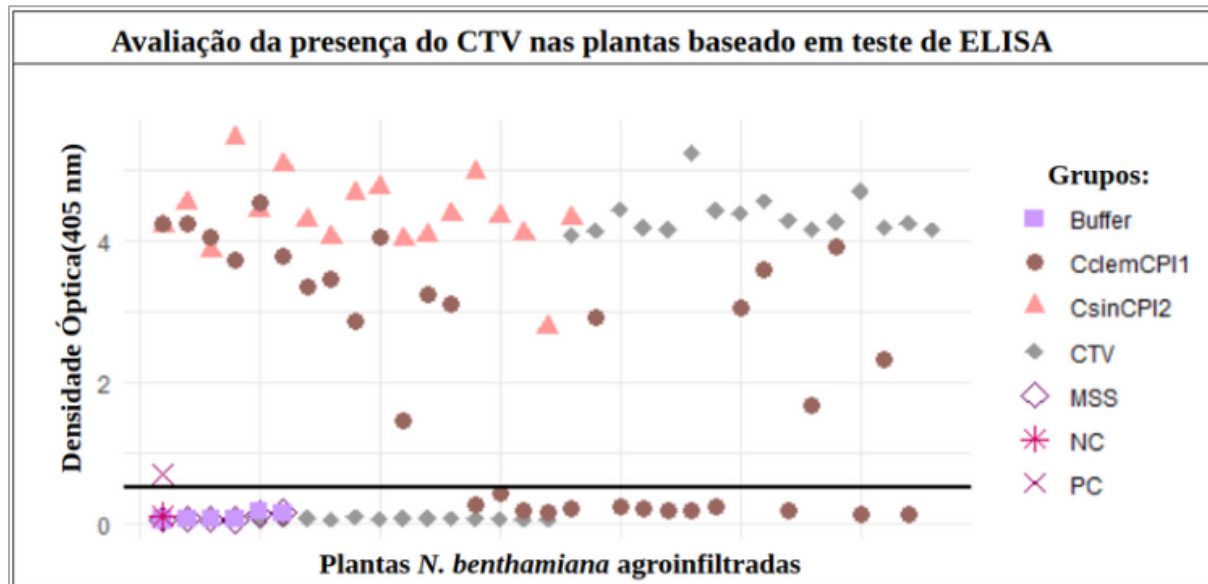


Fig. 27 – Esquema representativo do teste de ELISA realizado para confirmar a presença ou ausência do Citrus Tristeza Virus em *Nicotiana benthamiana* baseada na densidade ótica, em 405 nm de comprimento de onda. Como sugerido por Gowda e colaboradores (2005), um *threshold* é definido com base nos controles negativos utilizados nos experimentos (buffer, supressores -MSS, que são plantas saudáveis e não portadoras de vírus). Densidades óticas acima de 3,5 indicam um alto título viral em *N. benthamiana* e são preferidas para a purificação dos vírions e posterior inoculação em citros. Fonte: elaborado pela autora.

Assim, foi verificado que plantas dessa espécie inoculadas, presumidamente não hospedeiras, foram sistematicamente invadidas pelo CTV com uma alta titulação do vírus, nos quais sintomas da infecção sistêmica também foram observados. Após o teste de ELISA confirmar a presença do CTV, folhas de *N. benthamiana* foram coletadas cerca de seis semanas após infiltração e utilizadas para isolar, então, os vírions de CTV.

4.4 Inoculação *Bark-flap* dos vírions recombinantes em *C. macrophylla* e confirmação da presença dos genes de interesse carregados pelo vírus

As partículas virais multiplicadas em *N. benthamiana* e purificadas em sacarose 70% foram inoculadas mecanicamente pelo método *Bark-flap* em *C. macrophylla* e, após cerca de 60 dias, através de um teste de ELISA, confirmou-se a infecção viral sistêmica em tais plantas. Um total de nove plantas de *C. macrophylla* foram inoculadas com as partículas virais recombinantes contendo a cistatina CsinCPI-2 e quatro plantas com CclemCPI-1. Dessas plantas inoculadas que apresentaram infecção por CTV pelo teste de ELISA, foram determinadas como matrizes para inoculação dos vírions recombinantes para novas plantas de citros. Dessa forma, plantas de limão cravo foram enxertadas com borbulhas correspondentes às plantas positivas para cada construção para transferência do vírus recombinante.

No total, 26 plantas de Limão cravo foram enxertadas com borbulhas de *C. macrophylla* contendo a construção CTV316-4_CclemCPI-1, e no teste de ELISA 4 delas apresentaram um resultado positivo quanto a replicação do CTV, e devido ao baixo sucesso infectivo com essa construção, as plantas com resultado negativo foram reenxertadas (22 plantas). Ao todo, das 22 plantas que receberam as borbulhas novamente, 21 plantas testaram positivo de acordo com ensaio de ELISA. Para a cistatina CsinCPI-2, das 28 plantas previamente enxertadas, todas apresentaram resultado positivo para a infecção viral, do mesmo modo 26 plantas inoculadas com o CTV vazio (T36) apresentaram uma replicação bem-sucedida do CTV. Considerando a planta matriz para expressão de GFP, ela foi utilizada para a enxertia em 30 porta-enxertos de limão cravo, entretanto, apenas 13 se mostraram positivas no teste de ELISA. Dessa forma, as 17 plantas que apresentaram resultado negativo foram enxertadas novamente e em uma repetição do teste ELISA, 15 se mostraram infectadas por CTV. Assim pode ser dizer que o sucesso infectivo ao final para cada grupo de plantas foi de 96,15% para *C. macrophylla* contendo CclemCPI-1, para CsinCPI-2 100%, GFP 93,3% e 100% também para CTV316-4, controle.

De forma representativa, três plantas de cada tratamento, também foram avaliadas por meio de um ensaio RT-PCR, onde foi possível observar a presença de fragmentos que confirmam a presença das cistatinas CsinCPI-2 (amplicon de 648 pb), CclemCPI-1 (amplicon 682 pb) ou o gene que corresponde à GFP (amplicon 1058 pb) nas plantas testadas (Figura 28), ou mesmo a ausência de uma inserção gênica para as plantas controle livres de vírus ou contendo o vetor CTV316-4 vazio (341 pb) (Figura 28). O conjunto de primers utilizados hibridiza em CPM e CP (Tabela 2), genes que codificam para proteínas do capsídeo viral, que flanqueiam o gene alvo.

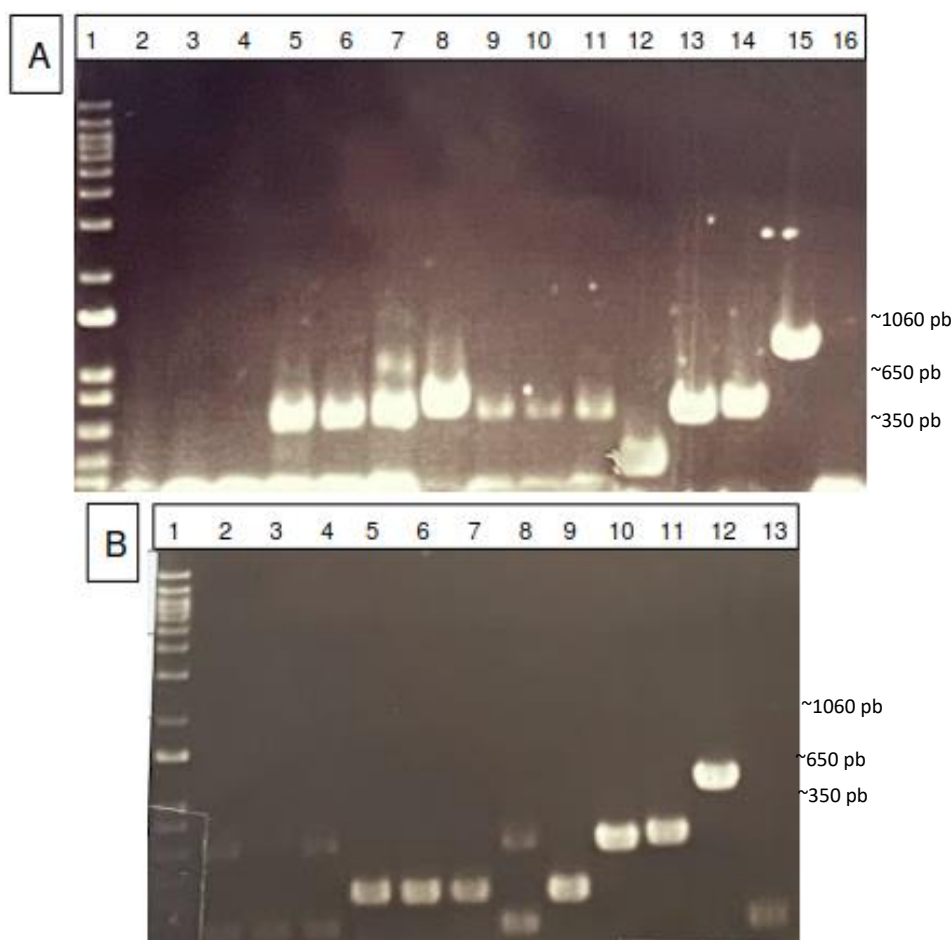


Fig. 28 – Confirmação da presença dos genes-alvo em exemplares de *Citrus macrophylla* previamente inoculadas com Citrus Tristeza Vírus. A) 1: marcador de DNA 1kb; 2-4: *C. macrophylla* + CTVGFP; 5-7: *C. macrophylla* + CTVCsinCPI-2; 8-10: *C. macrophylla* + CTVCclemCPI-1; 11: *C. macrophylla* livre de vírus controle; 12: plasmídeo CTV316-4; 13: plasmídeo CTV316-4_CsinCPI-2; 14: plasmídeo CTV316-4_CclemCPI-1; 15: plasmídeo CTV245-GFP; 16: controle negativo. B) 1: marcador de DNA 1kb; 2-4: *C. macrophylla* livres de vírus; 5-7: *C. macrophylla* + CTV316-4; 8: *C. macrophylla* livre de vírus controle; 9: plasmídeo CTV316-4; 10: plasmídeo CTV316-4_CsinCPI-2; 11: plasmídeo CTV316-4_CclemCPI-1; 12: plasmídeo CTV245-GFP; 13: controle negativo. Fonte: elaborado pela autora.

Considerando que as plantas mantiveram os genes de acordo com a análise de RT-PCR, podemos inferir que o CTV se mostrou estável e, possivelmente, a expressão das proteínas

CclemCPI-1 e CsinCPI-2 continuam ativas nas plantas, o que nos permitiu prosseguir para o ensaio biológico entre as plantas superexpressando as cistatinas e *D. citri*.

4.5 Ensaio de inoculação do psilídeo *D. citri* em plantas contendo as construções

CTV- cistatinas

Foram avaliadas dez plantas para cada tratamento, sendo o número inicial de ovos por broto foi de 19,2-20,2 ovos ($F = 0,393$; $df = 4$; $P = 0,813$), sendo que a viabilidade dos ovos foi de 85,9-93,9% ($F = 0,531$; $df = 4$; $P = 0,713$). O número inicial de ninfas por broto foi de 16,4-20,5 ninfas ($F = 0,738$; $df = 4$; $P = 0,571$) e a viabilidade ninfal 63,46-90,54% ($F = 1,839$; $df = 4$; $P = 0,138$) se mostrando semelhantes entre as plantas avaliadas (*C. macrophylla* livre de vírus; *C. macrophylla* + CTV316-4; *C. macrophylla* +CTVCsinCPI-2; *C. macrophylla* + CTVCclemCPI-1; *C. macrophylla* + CTVGFP) (Figuras 29, 30, 31 e 32). A menor viabilidade ninfal foi observada em insetos *D. citri* que se desenvolveram em *C. macrophylla* superexpressando a cistatina CclemCPI-1, ainda que este resultado não tenha se mostrado significativamente diferente dos outros grupos (Figura 32).

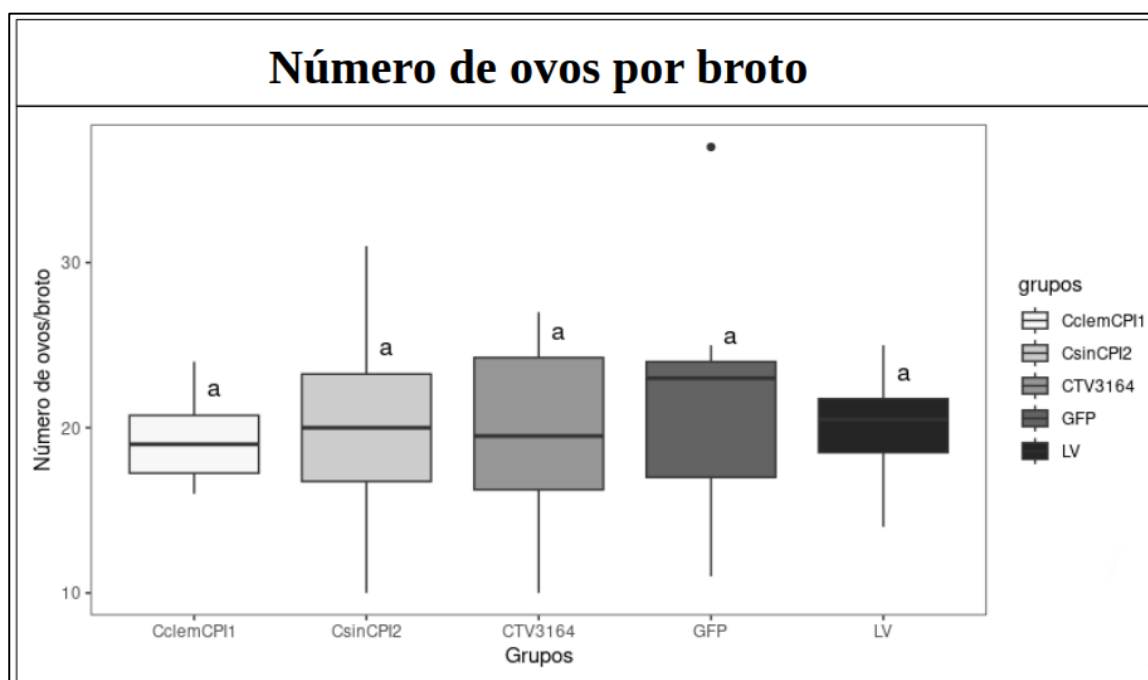


Fig. 29– Gráfico com o número médio de ovos de *D. citri* em *C. macrophylla*. Número médio de ovos considerando os cinco tratamentos: *C. macrophylla* livre de vírus, *C. macrophylla* + CTV316-4, *C. macrophylla* + CTVCclemCPI-1, *C. macrophylla* + CTVCsinCPI-2 e *C. macrophylla* + CTVGFP. Não houve diferença estatística entre os tratamentos baseado na análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($F = 0,393$; $df = 4$; $P = 0,813$). Análise realizada no Software RStudio (R 4.3.2).

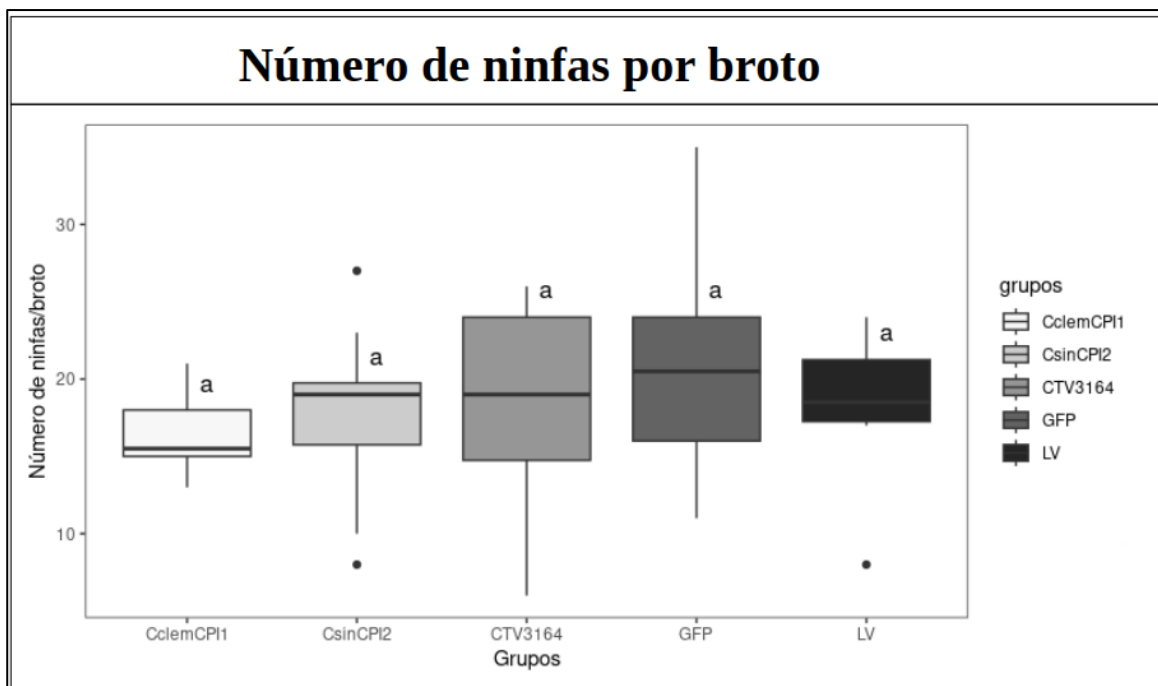


Fig. 30 – Gráfico com o número médio de ninfas de *D. citri* eclodidas em *C. macrophylla*. Número médio de ninfas eclodidas por broto considerando os cinco tratamentos: *C. macrophylla* livre de vírus, *C. macrophylla* + CTV316-4, *C. macrophylla* + CTVCclemCPI-1, *C. macrophylla* + CTVCsinCPI-2 e *C. macrophylla* + CTVGFP. Não houve diferença estatística entre os tratamentos baseado na análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($F = 0,738$; $df = 4$; $P = 0,571$). Análise realizada no Software RStudio (R 4.3.2).

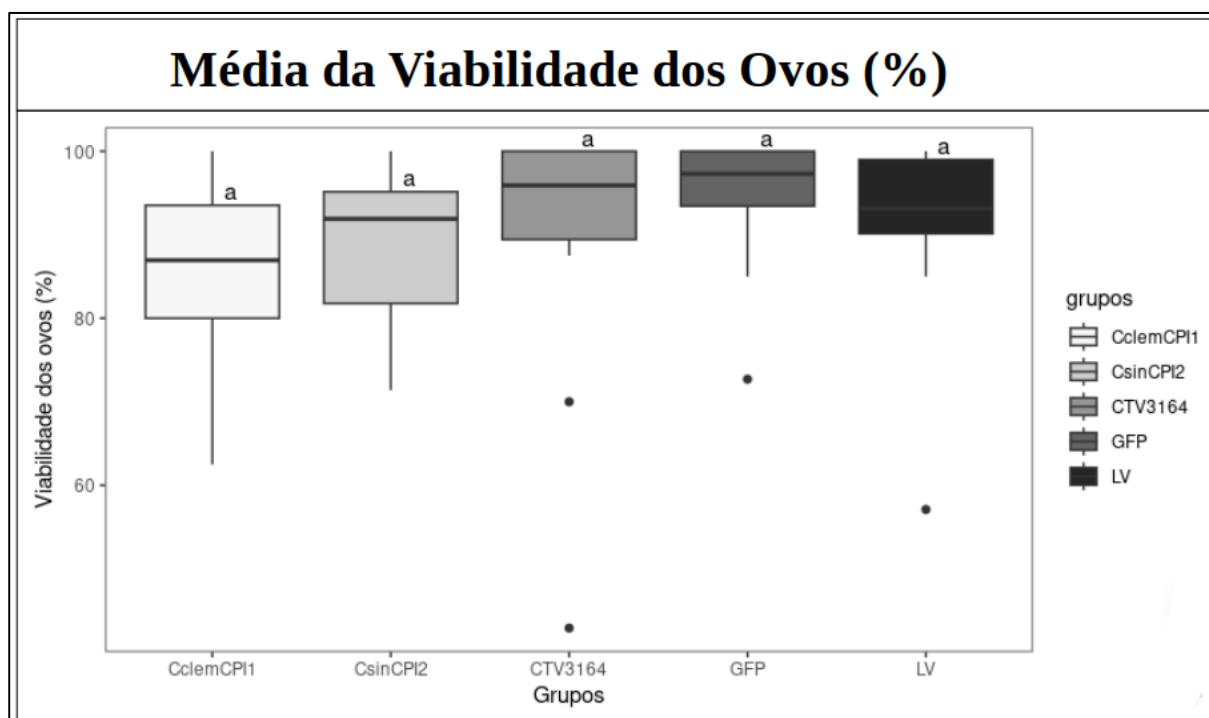


Fig. 31 – Gráfico com média da viabilidade dos ovos de *D. citri* em *C. macrophylla*. Número da viabilidade média dos ovos considerando os cinco tratamentos: *C. macrophylla* livre de vírus, *C. macrophylla* + CTV316-4, *C. macrophylla* + CTVCclemCPI-1, *C. macrophylla* + CTVCsinCPI-2 e *C. macrophylla* + CTVGFP. Não houve diferença estatística entre os tratamentos baseado na análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($F = 0,531$; $df = 4$; $P = 0,713$). Análise realizada no Software RStudio (R 4.3.2).

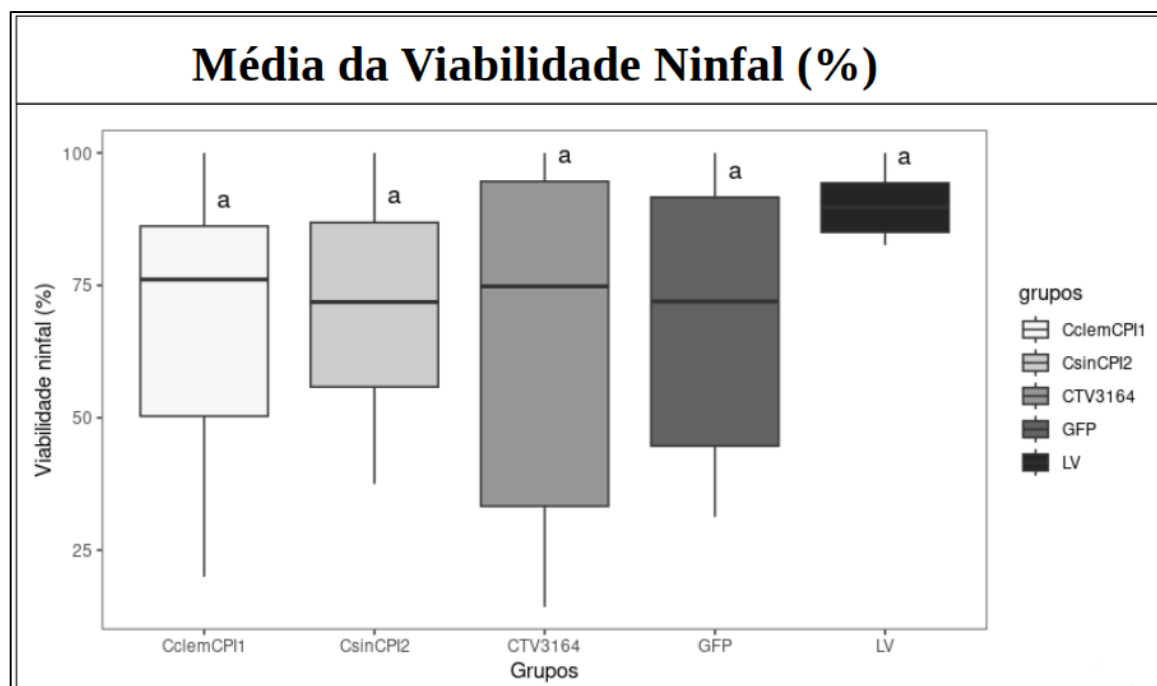


Fig. 32 – Gráfico com média da viabilidade dos ninfal de *D. citri* em *C. macrophylla*. Número da viabilidade média ninfal considerando os cinco tratamentos: *C. macrophylla* livre de vírus, *C. macrophylla* + CTV316-4, *C. macrophylla* + CTVCclemCPI-1, *C. macrophylla* + CTVCsinCPI-2 e *C. macrophylla* + CTVGFP. Não houve diferença estatística entre os tratamentos baseado na análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($F=1,839$; $df= 4$; $P= 0,138$). Análise realizada no Software RStudio (R 4.3.2).

5 DISCUSSÃO

O uso de vetores baseados em vírus de plantas têm sido amplamente empregados para o estudo e desenvolvimento de plantas resistentes à patógenos ou insetos por meio da superexpressão de proteínas ou do silenciamento gênico (Khan et al., 2013; Hajeri et al., 2014; Wang et al., 2009; Khan et al., 2015; Kolliopoulou et al., 2017). O uso desses vetores na elaboração de medidas de proteção de culturas se mostra atrativo, visto que é um método mais rápido e não requer a remoção de plantas para a substituição por organismos melhorados como no método tradicional, sendo possível a adição de genes ou novas características às plantas-alvo já existentes no campo (El-Mohtar e Dawson, 2014).

Assim, alternativamente à expressão de proteínas na próxima geração de plantas pelos métodos convencionais, sequências heterólogas podem ser expressas na presente geração de plantas usando vetores baseados em vírus vegetais (El-Mohtar e Dawson, 2014). Seguindo esta mesma perspectiva, o vetor viral CTV, um vetor baseado em um vírus de plantas cítricas (Folimonov et al., 2007) foi desenvolvido e tem apresentado produções consideráveis de proteínas heterólogas com uma atrativa estabilidade (El-Mohtar e Dawson, 2014). Dentre os destaques do uso do CTV para expressão heteróloga em citros, podemos dizer que este vetor foi desenhado visando minimizar a replicação e o movimento sistêmico em citros enquanto o nível para a produção da proteína heteróloga é maximizado (Shivprasad et al., 1999).

De modo geral, o vetor CTV é bastante tolerante a manipulações em diversas regiões do genoma ampliando a quantidade de estratégias viáveis que podem ser utilizadas com este material (El-Mohtar e Dawson, 2014). Entretanto, testes com a inserção gênica em posições arbitrárias demonstraram que genes mais próximos a porção 3' são transcritos mais abundantemente que em outras regiões (Satyanarayana et al., 1999). Assim, embora seja encontrada uma alta permissividade na manipulação do CTV, sabe-se que a acomodação de genes médios e grandes entre CPm e CP apresentam em melhores resultados de produção proteica (El-Mohtar e Dawson, 2014). Contudo, a maior vantagem do CTV como vetor de expressão está em sua estabilidade, onde foi demonstrada a produção contínua da proteína GFP em citros por mais de dez anos (El-Mohtar e Dawson, 2014), contrariando as expectativas de uma expressão nominalmente transiente.

De acordo, neste trabalho desenvolvemos a construção gênica com a inserção independente das cistatinas CclemCPI-1 e CsinCPI-2 em vetor viral CTV316-4. Ambos os genes correspondentes às cistatinas estão flanqueados por CPm e CP posicionados na região 3' estrategicamente, visando garantir a alta produtividade das cistatinas-alvo em citros (El-Mohtar

e Dawson, 2014). Além disso, apesar da reprodução fiel da totalidade de genes de um vírus com um genoma de 20 kb por meio de manipulações genéticas ser um desafio (Ambrós et al., 2001), foi possível confirmar por meio do sequenciamento de DNA que os genes das cistatinas foram inseridos corretamente na região de interesse, bem como baseada em análises de restrição, a integridade do vetor viral CTV316-4 foi preservada, reforçando a permissividade do CTV quanto à sua manipulação (Folimonov et al., 2007; El-Mohtar e Dawson, 2014).

Dessa forma, após a confirmação da integridade das construções, suspensões celulares de *A. tumefaciens* previamente transformadas com as construções gênicas de interesse (CTV+cistatinas) foram utilizadas no processo de agroinoculação de *N. benthamiana* (Gowda et al., 2005). Como resultado, observou-se que esta planta presumidamente não hospedeira foi sistemicamente infectada por CTV (T36) em altos títulos, assim como previamente descrito por Ambrós e colaboradores (2013). Isto se confirma pela aparição dos sintomas característicos como epinastia das folhas, clareamento das nervuras e necrose das folhas e morte da planta após 2-4 meses (Ambrós et al., 2011). Ainda, além da confirmação de altos títulos de CTV através de teste de ELISA, a infecção sistêmica foi confirmada em *N. benthamiana* através da fluorescência, com a utilização da construção CTV+GFP, gentilmente cedida pelo Fundecitrus. Por meio de uma luz ultravioleta, foi possível visualizar a expressão da proteína GFP não apenas na porção em que ocorre a agroinfiltração (porção abaxial das folhas), mas sim em toda a folha, flores e no caule.

O sucesso da infecção sistêmica pelo CTV em uma herbácea se deu pela co-infiltração de supressores de silenciamento, o que resulta na aceleração da infecção sistêmica e aumenta a infectividade viral (Ambrós et al., 2011). Ademais, esse sistema se baseia na capacidade do vírus de se multiplicar em células de *N. benthamiana* e de se movimentar célula-a-célula e em longas distâncias na planta (Ambrós et al., 2013), o que pôde ser evidenciado nas plantas contendo a construção CTV + GFP, onde é notável, devido a intensidade da fluorescência, a expressão da proteína GFP o que denota uma replicação bem-sucedida do vírus, bem como os sinais de fluorescência em outros tecidos indicam o sucesso na movimentação viral pela planta (Ambrós et al., 2011; Ambrós et al., 2013; El-Mohtar e Dawson, 2014).

Desse modo, a *N. benthamiana* foi utilizada como um hospedeiro intermediário permitindo a multiplicação do vírus recombinante. Após alcançar títulos virais satisfatórios que indicaram a infecção sistêmica, as folhas infectadas foram utilizadas para a purificação dos vírions (Robertson et al., 2005). É sabido que plantas de citros inoculadas mecanicamente com vírions produzidos em *N. benthamiana* (Robertson et al., 2005) apresentam os sintomas

característicos do isolado *wild-type* CTV-T36 e se restringem ao floema vegetal, o que sugere que a replicação desses vírus em benthamiana não comprometem as propriedades originais do CTV-T36 (Ambrós et al., 2013). Os vírions recombinantes (ex.: CTV + cistatinas) foram então purificados partindo de folhas infectadas de *N. benthamiana* e inoculados em *C. macrophylla* (Robertson et al., 2005). Após cerca de 60 dias confirmou-se a infecção sistêmica em citros por meio de teste de ELISA. Além do mais, uma RT-PCR, validou a presença dos genes de interesse nas plantas, o que reforça a conhecida estabilidade do vetor CTV e sua habilidade em carrear genes/proteínas sistemicamente pela planta. A presença do gene-alvo nos permite inferir que há a expressão da proteína de interesse, ainda que essa inferência precisa ainda ser confirmada.

A despeito da utilização do CTV como ferramenta, sobre as moléculas-alvo, coleópteros e hemípteros tendem a usar majoritariamente cisteíno-peptidases em seus processos digestivos (Murdock et al., 1987) e, por isso, as cistatinas estão entre as moléculas inibidoras de peptidases mais exploradas contra pragas vegetais (Singh et al., 2020). Isso se deve a habilidade das cistatinas de inibir cisteíno-peptidases heterólogas (Lipke et al., 1954; Soares-Costa et al., 2001; Schneider et al., 2017). Uma vez que a inibição das cisteíno-peptidases mediada pela cistatina interfere na quantidade de proteínas digeridas, o resultado será insetos fracos, com crescimento comprometido e eventual morte (Lawrence e Koundal, 2002). Assim a atuação dessas moléculas como proteínas de defesa vegetal contra patógenos e insetos herbívoros tem se tornado alvo de muitos estudos. Pensando no manejo integrado de pragas (MIP), que combina estratégias e práticas de manejo para obtenção de culturas saudáveis minimizando o uso de pesticidas e visando o controle de pragas mais sustentável (FAO, 2024), o estabelecimento de culturas superexpressando cistatinas como alternativa de manejo se mostra bastante viável.

A primeira cistatina de cana-de-açúcar caracterizada e produzida *in vitro*, por exemplo, descrita por nosso grupo apresentou potencial antifúngico contra *Trichoderma reesei* (Soares-Costa et al., 2002). Além disso, foi observada uma redução no peso médio de insetos *Sphenophorus levis* que se alimentaram em cana-de-açúcar superexpressando a cistatina CaneCPI-1 quando comparados aos que se alimentaram de plantas não-transgênicas, observado em trabalhos anteriores realizados por nosso time de pesquisa (Schneider et al., 2017). Também, mostrou-se que em beringela (*Solanum melongena*) a expressão de uma cistatina de arroz modificada inibiu em 78,3% o sucesso reprodutivo do nematoide-praga *Meloidogyne incognita* (Papolu et al., 2016). Do mesmo modo, cistatinas de citros foram produzidas de forma recombinante e por meio de ensaios *in vitro* mostraram alto potencial inibitório contra cisteíno-

peptidases (Schneider et al., 2020). Especificamente, a cistatina 1 de *Citrus clementina* (CclemCPI-1) se mostrou eficaz na inibição da Catepsina B -like de *D. citri* (DcCathB) (Schneider et al., 2020) enquanto a cistatina 2 de *Citrus sinensis* (CsinCPI-2) inibiu fortemente a enzima Catepsina L -like do mesmo psilídeo (DcCathL) (Ferrara et al., 2020), vetor do HLB.

A propósito, um vetor CTV-RNAi foi utilizado recentemente em citros visando o silenciamento das cisteíno-peptidases DcCathB e DcCathL em *D. citri* e ficou evidente a importância dessas enzimas para o desenvolvimento do organismo, visto que após o silenciamento gênico as fêmeas do psilídeo apresentaram uma redução no número de oócitos maduros bem como uma má formação dos ovários (Ibanez et al., 2023), caracterizando as catepsinas como potenciais alvos para limitar a disseminação do HLB, o que reforça também a usabilidade do CTV para carrear as cistatinas em citros visando o manejo do psilídeo *D. citri*. Vale destacar também, que devido o CTV colonizar especificamente células associadas ao floema, a proteína de interesse também será expressa em grande quantidade no mesmo local, que providencialmente também é fonte de alimento para o inseto *D. citri* favorecendo assim, a interação entre a cistatina vegetal e catepsina-alvo do inseto.

Com todas essas considerações, a estratégia utilizada neste trabalho e apresentada neste capítulo resumidamente foi o emprego do vetor viral CTV para a superexpressão de cistatinas em citros visando a inibição das catepsinas-alvo (DcCathB e DcCathL) de *D. citri* para o controle do inseto. No entanto, apesar das etapas de construção gênica, agroinfiltração em *N. benthamiana*, purificação dos vírions recombinantes e inoculação em *C. macrophylla* terem sido bem-sucedidas, no ensaio biológico, ainda não obtivemos os resultados esperados. Considerando o ensaio biológico, as plantas superexpressando as cistatinas apresentaram resultados semelhantes àquelas controle (plantas apenas com CTV e livres de vírus).

No entanto, como objetivado, o desafio da obtenção das plantas transformadas com o CTV recombinante para a expressão das cistatinas-alvo foi alcançado. Claramente, o ensaio biológico será repetido, considerando que os resultados aqui apresentados correspondem a uma avaliação preliminar. Apesar de todas as vantagens apresentadas na utilização do sistema viral para a expressão de proteínas, deve-se considerar que são inúmeros os desafios existentes na execução de um ensaio biológico, que incluem a eficácia na expressão da proteína, a eficiência do inseto em capturar a proteína inibidora ao se alimentar da planta e a avaliação minuciosa de um organismo tão complexo. Dessa forma, a repetição do ensaio biológico para as plantas contendo o CTV e os insetos será nosso próximo desafio.

No entanto, pudemos confirmar que o CTV é uma ferramenta biotecnológica muito versátil que pode ter diversas aplicações. Apesar de seu uso não ser trivial, existem vantagens como a sua rapidez em comparação ao desenvolvimento de transgênicos, por exemplo, podendo ser aplicado para a validação de alvos. O fato de o CTV ser eficientemente passado através da enxertia de borbulhas, facilita e agiliza o processo de transferência de um gene alvo para novas plantas. Pensando no controle de pragas, essa vantagem se intensifica já que após ter se estabelecido uma molécula alvo eficaz, o CTV pode facilmente ser propagado em plantas já no campo, evitando a remoção e replantação de novas plantas melhoradas (El-Mohtar e Dawson, 2014).

No entanto, estas facilidades e vantagens associadas ao uso do CTV se refere ao seu emprego na Flórida, considerando a variante CTV (T36) utilizada neste trabalho. Pois embora tal vetor viral tenha apresentado considerável estabilidade e boa expressão proteica (Dawson e El-Mohtar, 2014), não seria adequado seu emprego no Brasil sem uma prévia análise de risco, uma vez que o comportamento desta linhagem de CTV não foi relatada nas cultivares e clima brasileiros. Além disso, a laranjeira doce “Pera” é a principal variedade cultivada no cinturão citrícola, mas não é cultivada na Flórida, apresentando-se ainda suscetível à infecção por CTV, gerando caneluras que afetam sua produtividade. A pré-imunização desta cultivar com o complexo viral CTV Pera IAC (PIAC) mantém seu potencial produtivo (Müller, 1980). Dessa forma, o CTV (T36) é uma ferramenta ótima para o estudo e investigação de moléculas-alvo potenciais e, sua implementação também deve ser efetiva nos locais que já de antemão contenham tal variante viral. Para o emprego no território nacional, idealmente, deverá ser empregada uma variante do vírus já existente no país.

Considerando as moléculas-alvo, dados interessantes na literatura evidenciam a eficácia do uso de cistatinas no controle de hemípteros (Martinez et al., 2016; Schneider et al., 2020), o que reforça a importância de uma padronização e uma investigação mais acurada dessas plantas superexpressando as cistatinas CclemCPI-1 e CsinCPI-2 mediadas pelo CTV em tempo hábil. Além disso, é amplamente difundida a importância das cisteíno peptidases (catepsinas) no desenvolvimento dos hemípteros (Ferrara et al., 2015; 2020; Ibanez et al., 2023), o que reforça a escolha desse alvo. Partindo das nossas perspectivas iniciais, acreditamos que essa estratégia se mostra muito promissora para o desenvolvimento de uma estratégia de manejo do psilídeo *D. citri*, vetor do HLB.

6 CONCLUSÃO

- Podemos concluir que neste trabalho, foi possível obter as construções gênicas baseadas em vetor viral CTV contendo as cistatinas de citros CclemCPI-1 e CsinCPI-2, bem como a multiplicação dos vírions recombinantes em *N. benthamiana*.

- A infecção viral sistêmica nessas plantas herbáceas foi bem-sucedida e propiciou o isolamento das partículas virais infectivas. A inoculação dos vírions recombinantes em citros foi devidamente executada e a infecção sistêmica foi alcançada. Dessa forma, através da enxertia de borbulhas, o CTV recombinante (CTV- cistatinas) foi satisfatoriamente propagado para novas plantas.

- O ensaio biológico entre plantas de citros contendo as construções CTV-cistatinas e o psilídeo *D. citri* deverá ser repetido, considerando que os resultados aqui apresentados representam uma avaliação preliminar.

- Entretanto, o CTV ainda assim se mostra uma ferramenta muito versátil e mais testes deverão ser realizados para validar seu uso na superexpressão de cistatinas nas plantas e efetivar tal estratégia como alternativa de controle do psilídeo, *D. citri*.

As nossas perspectivas futuras incluem verificar a superexpressão das cistatinas nos tubos crivados, além da otimização e repetição do ensaio biológico entre as plantas superexpressando as cistatinas por meio do CTV (CTV+cistatinas) e os insetos *D. citri*.

CAPÍTULO II: Estudos funcionais utilizando dietas artificiais contendo cistatinas recombinantes visando desenvolver estratégias para o manejo de *D. citri*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Interação vetor-bactéria-planta

Os hemípteros são pragas devastadoras de diversas culturas devido a sua vasta gama de hospedeiros, à sua rápida reprodução, e sua conhecida versatilidade em transmitir, como vetores, agentes patogênicos que infectam plantas (Perilla-Henao e Casteel, 2016). Dessa forma, os hemípteros são conhecidos como os mais importantes vetores de patógenos vegetais (Nault e Ammar, 1989; Orlovskis et al., 2015). Com isso, nas últimas décadas os insetos vetores de pragas vegetais têm recebido grande atenção por serem responsáveis por vastos danos econômicos à indústria agrícola (Killiny, 2022), com mais de 700 doenças vegetais ligadas à patógenos transmitidos por insetos (Gottwald et al., 2010).

O sistema vascular das plantas é rico em nutrientes e representa uma via de transporte para os patógenos. É constituído por tecidos do floema e do xilema. O floema consiste em células companheiras, que fornecem componentes metabólicos e reguladores para a seiva elaborada, e elementos do tubo crivado, formando um sistema de transporte de longa distância em toda a planta (Turgeon, 2006). Uma vez que o floema oferece acesso a uma rica fonte de carboidratos, proteínas e aminoácidos, diversos microrganismos virais e bacterianos colonizam especificamente este tecido (Bove e Garnier, 2002; Lough e Lucas, 2006). Em contraste, apesar do baixo teor de nutrientes do xilema, foram também identificados agentes patogênicos de plantas que podem colonizar esse vaso (Purcell e Hopkins, 1996; Bae et al., 2015).

Enquanto nos últimos anos têm-se afluído os estudos das interações entre planta, o hemíptero vetor e um patógeno viral, ainda pouco se sabe acerca das interações entre planta, o hemíptero e o patógeno bacteriano (Ng e Falk, 2006; Hogenhout et al., 2008; Walling, 2008; Ammar et al., 2011; Blanc et al., 2011, 2014; Gray et al., 2014; Gilbertson et al., 2015; Whitfield et al., 2015). Estudar as relações existentes entre vetor-patógeno-hospedeiro se faz importante, pois, permite uma melhor compreensão da epidemiologia das doenças vegetais (Killiny, 2022).

Nos últimos anos, bactérias transmitidas por vetores têm sido as principais responsáveis por causarem as doenças mais graves que atingem culturas vegetais anuais e perenes. O melhor exemplo neste sentido é a bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), associada ao Huanglongbing (HLB) que atinge plantas cítricas e está amplamente disseminada mundialmente, trazendo prejuízos que ultrapassam os bilhões de dólares a cada ano (Gottwald,

2010). A eficiência na transmissão do patógeno depende intrinsecamente das interações específicas existentes entre o inseto e a planta, e a biologia do patógeno (Perilla-Henao e Casteel, 2016).

Nessa mesma perspectiva, de acordo com a “hipótese de manipulação do hospedeiro”, patógenos são capazes de manipular o inseto-vetor alterando seu comportamento, bem como a resposta da planta-hospedeira a fim de garantir sua infecção e disseminação (Wang e Trivedi, 2013; Bové, 2006; Dodds e Rathjen, 2010; Cong et al., 2012). Nessa interação entre plantas e insetos, secreções salivares, por exemplo, têm sido consideradas importantes (Matsumoto e Hattori, 2018; Yang et al., 2017; Naessens et al., 2015; Giron et al., 2016) por conterem moléculas efetoras que promovem a ativação ou supressão do sistema de defesa vegetal, resultando na inibição ou infestação pelos insetos (Mutti et al., 2018; Wang et al., 2015).

Por outro lado, dependendo dos efeitos da bactéria sobre o *fitness* do inseto vetor, a interação entre a bactéria e o vetor pode ser considerada parasitária, mutualista ou comensal ou pode situar-se em alguma posição intermediária (Ghanim et al. 2016; Nachappa et al. 2014). Acredita-se que a maioria dos patógenos também provocam doenças, até certo ponto, em seus insetos vetores (Nachappa et al. 2014). Alguns patógenos de plantas podem conferir benefícios de *fitness* para o vetor (Belluire et al. 2008; Purcell 1982; Stout et al. 2006). No entanto, estudar os efeitos diretos dos fitopatógenos em seus vetores é desafiador visto que grande parte dos patógenos vegetais transmitidos por vetores ainda não foram cultivados *in vitro* (Killiny, 2022), o que inclui a bactéria CLas associada ao HLB.

Tem sido demonstrado que há um perfil de expressão gênica diferente para CLas quando coloniza sua planta hospedeira em comparação a sua colonização no inseto vetor, o que sugere que CLas reage ao seu duplo estilo de vida. Mais especificamente, CLas parece modificar diversas vias em *D. citri* para acessar à maquinaria celular desse hospedeiro e favorecer sua transição para a planta (Killiny, 2022). O êxito na transmissão da bactéria pelo seu inseto vetor está atrelado a capacidade de CLas de colonizar e prosperar em dois hospedeiros diferentes (*Citrus spp.* e *D. citri*), a capacidade de CLas de transicionar rapidamente entre plantas de *Citrus* e o psílídeo e vice-versa, e as interações tritróficas bem-sucedidas entre CLas- citros- *D. Citri* (Killiny, 2022).

Do mesmo modo, considerando ainda o patossistema do HLB, foi demonstrada uma alteração no perfil transcricional na planta hospedeira mediada por CLas (Martinelli et al., 2012; Fu et al., 2016; Hu, et al., 2017), além da infecção em tecidos como glândulas salivares e intestino do inseto, que frequentemente são barreiras naturais na prevenção da translocação dos

patógenos dentro do hospedeiro (Ammar et al., 2011; Ammar et al., 2016; Ammar et al., 2020). Dessa forma, o estudo das interações proteicas nos trazem pistas informativas para o entendimento de vias e predição de funções importantes (Ito et al., 2001; Rain et al., 2001) podendo ser também alvos para o desenvolvimento de estratégias mais específicas para o manejo do HLB (Cossar et al., 2020).

1.2 interação proteína-proteína

As interações proteína-proteína são fundamentais em todos os processos celulares, pois participam na modificação de atividades proteicas e enzimáticas, catálise e reações metabólicas e ativação de vias de sinalização (Kühner et al., 2009), estando associadas a alterações responsivas nos hospedeiros vegetais, ou no inseto-hospedeiro, por exemplo. Não obstante, as plantas ao longo da evolução desenvolveram diferentes mecanismos de defesa, envolvendo respostas fisiológicas e bioquímicas que tem por função impedir a invasão dos patógenos, bem como reagir a estresses abióticos.

De acordo, o advento de ferramentas moleculares e proteômicas tem possibilitado o estudo de proteínas envolvidas em importantes interações nas relações patógeno-hospedeiro, permitindo a elucidação de novos processos biológicos que atuam na regulação desses patógenos intracelulares (Huang et al., 2020). Dentre essas proteínas importantes, tem-se as catepsinas que pertencem ao grupo das enzimas proteolíticas cisteíno-peptidases (Rawlings e Barret, 1994; Rawlings et al., 2018). Elas estão envolvidas em processos biológicos fundamentais de *D. citri* como embriogênese, metamorfose, digestão (Ferrara et al., 2015; 2020; Xue et al.; 2019; Terra e Ferreira et al., 1994; Ibanez et al., 2023), além da atuação na resposta imune do inseto (Yu et al., 2019). Previamente, foi demonstrada por nosso grupo, a regulação gênica da vitelogenina mediada pelas Catepsinas DcCathL e DcCathB em *D. citri* (Ibanez et al., 2023). Observou-se aumento da expressão de Vitelogenina (Vg) (Jaiswal, et al., 2021) nas glândulas salivares do inseto-vetor quando infectados por CLas, evidenciando a mediação bacteriana na regulação de tais genes/proteínas, o que sugere o envolvimento de tais moléculas na interação inseto-planta hospedeira.

Em contrapartida, desempenhando um importante papel no sistema de defesa vegetal, proteínas inibidoras de cisteíno peptidases, denominadas fitocistatinas, atuam bloqueando a ligação do substrato ao sítio ativo da enzima, inibindo sua ação proteolítica (Xue et al., 2019). Nas plantas, essas moléculas estão associadas à regulação endógena de cisteíno peptidases na germinação de sementes, morte celular programada, resposta a condições de estresse, resposta

contra as cisteíno peptidases de insetos herbívoros e patógenos (Benchabane et al., 2010; Martinez et al., 2016; Christova et al., 2018), sendo amplamente usada no manejo integrado de pestes (Soares-Costa et al., 2002; Papolu et al., 2016; Xue et al., 2019). Nosso grupo de pesquisa, previamente, descreveu cistatinas de *Citrus sinensis* e *Citrus clementina* (Schneider et al., 2020) e cisteíno peptidases, do tipo catepsinas, de *D. citri* (Ferrara et al., 2015; Ferrara et al., 2020).

As catepsinas DcCathB e DcCathL podem ser inibidas pelas cistatinas vegetais (Schneider et al., 2020) e podem regular a expressão de Vg em *D. citri* (Ibanez et al., 2023). Tais catepsinas quando silenciadas utilizando RNAi (CTV-RNAi) além de indicar uma regulação de Vg no psilídeo, desencadeou numa menor produção de ovócitos maduros além de uma má formação ovariana em *D. citri*, reforçando a interação de tais proteínas (Ibanez et al., 2023), provavelmente reguladas por CLas.

Evidentemente, as redes de interações proteicas existentes entre CLas-*D. citri*-citros são bastante complexas e pouco compreendidas. Porém, seu estudo se faz urgente com base no atual cenário. Assim, neste trabalho, usamos análise de expressão gênica, técnicas de localização subcelular, um teste preliminar de duplo-híbrido em levedura (*Yeast two-hybrid* - Y2H) e dieta artificial e ensaio para eclosão de ovos de *D. citri* em meio artificial para investigar as interações CLas- inseto vetor, com ênfase nas catepsinas-alvo.

Considerando que as interações proteicas são determinantes cruciais das infecções virais e da transmissão por insetos (Chavez e Cilia et al., 2012), sugerindo ainda que os vírus alteram o comportamento do vetor controlando as interações do vetor com sua planta hospedeira (Pinheiro et al., 2017), essas interações proteicas também devem ser importantes em doenças que envolvem infecções bacterianas (Schweppe et al., 2015). No entanto, as interações vírus-vetor de plantas têm sido amplamente estudadas nos últimos tempos, contrastando com as interações planta-bactéria-vetor, envolvidas em doenças muito prejudiciais, que ainda são pouco compreendidas (Perilla-Henao e Casteel, 2016).

Assim, a fim de verificarmos a efetividade da interação catepsina-cistatina *in vivo*, ensaios de dieta artificial foram realizados com população de insetos livre de bactéria e infectados por CLas, para verificar a influência da bactéria na resposta do inseto, esperando que o estudo de tais moléculas-alvo possa trazer avanços na nossa compreensão acerca do patossistema HLB. A investigação das interações proteicas envolvendo as enzimas DcCathB e DCcathL, fundamentais nos processos regulatórios e no desenvolvimento de *D. citri* (Ferrara et al., 2015; Ferrara et al., 2020; Ibanez et al., 2023) que podem efetivamente serem inibidas

pelas cistatinas de citros (Schneider et al., 2020), podem se mostrar como importantes alvos, uma vez que estudos envolvendo CPIs no controle de pragas têm sido amplamente explorados (Soares-Costa et al., 2002; Papolu et al., 2016; Schneider et al., 2017; Xue et al., 2019; Ibanez et al., 2023).

Vale ressaltar que, devido à impossibilidade de cultivo laboratorial de CLas, a rápida disseminação da bactéria por um inseto vetor, além de sua latência prolongada, há uma maior dificuldade no manejo da doença (Teixeira et al., 2017) e até mesmo o seu estudo. Além disso, as bactérias transmitidas por vetores desenvolveram estratégias complexas para interagir com seus insetos vetores hemípteros e plantas hospedeiras (Huang et al., 2020). Assim, todo esse cenário caracteriza a urgência de estudar e desenvolver novas estratégias para controlar o HLB. Com sucesso, o surgimento de algumas ferramentas moleculares e ensaios de dieta artificial tem permitido o estudo de proteínas envolvidas em interações importantes nas relações patógeno-hospedeiro, possibilitando a elucidação de novos processos biológicos que regulam tais patógenos intracelulares (Huang et al., 2020).

Este trabalho teve como objetivo melhorar nossa compreensão das relações entre bactérias e o inseto vetor (*D. citri* - CLas) com foco nas proteínas DcCathB e DcCathL. Deste modo, a possibilidade de usar inibidores específicos, como as cistatinas, capazes de interferir nas interações bactéria-vetor-planta hospedeira deve favorecer o desenvolvimento de uma estratégia promissora para retardar a disseminação da doença HLB (Martinez et al., 2009; Ramsey et al., 2017; Levy et al., 2018; Ammar et al., 2019).

O desenvolvimento deste trabalho foi possibilitado através da realização de um estágio BEPE (Fapesp), durante um ano, desenvolvido no laboratório de “Plant Pathology” sob supervisão do prof. Dr. Amit Levy, no *Citrus Research and Education Center*, da *University of Florida*, USA.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a compreensão das relações entre a bactéria CLas e o inseto vetor *D. citri*, com foco nas proteínas DcCathB e DcCathL; buscando principalmente validar o uso de inibidores (cistatinas CclemCPI-1 e CsinCPI-2) capazes de interferir nas interações bactéria-vetor, para o desenvolvimento de uma estratégia para retardar a disseminação da doença HLB

2.1 Objetivos específicos

- Construção dos vetores contendo os genes correspondentes às cistatinas de citros CclemCPI-1 e CsinCPI-2, e a catepsina DcCathL para ensaio Y2H;
- Ensaio de Y2H entre cistatinas de citros e a DcCathL de *D. citri*;
- Análise da expressão gênica diferencial (qPCR e FISH) das catepsinas DcCathB e DcCathL em *D. citri* na presença ou ausência de CLas;
- Imunolocalização da proteína DcCathL em órgãos de *D. citri* na presença e ausência da bactéria CLas, e predição da localização subcelular de DcCathB e DcCathL *in silico*;
- Confirmação da eficiência dos ensaios de dieta artificial na entrega de proteínas recombinantes, utilizando como modelo a proteína GFP;
- Ensaio de dieta artificial contendo ou não as cistatinas-alvo para ninfas ou adultos de *D. citri* em populações de inseto na presença ou ausência de CLas;
- Ensaio de eclosão de ovos de *D. citri* em meio artificial contendo ou não a cistatina CsinCPI-2;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção dos insetos e material vegetal

Adultos e ninfas de colônias de *D. citri* livres de bactéria CLas (CLas -) e infectadas com CLas (CLas +) foram mantidos sob condições controladas em plantas de *Murraya koenigii* e *Citrus macrophylla*, respectivamente, na Universidade da Flórida (*Citrus Research and Education Center* - CREC; Lake Alfred -FL, EUA).

3.2 Ensaio de duplo híbrido ou *Yeast two-hybrid* (Y2H)

A sequência da ORF da catespina DcCathL, de *D. citri*, de comprimento total foi amplificada e ligada ao vetor pGBKT-7 (BD) (Figura 33A), e as ORFs das cistatinas de citros, CclemCPI-1 e CsinCPI-2, foram amplificadas e ligadas ao vetor pGADT-7 (AD) (Figura 33B) usando primers específicos (Tabela 3). As construções usadas para testar as interações proteína-proteína foram cotransformadas na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Y2HGold) usando o Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System (Takara Bio Inc.), seguindo as instruções do fabricante. A cotransformação dos vetores pGBKT7-Lam e pGADT7-T foi usada como controle negativo, e pGADT7 e pGBKT7-53 como controle positivo. Além disso, realizou-se a cotransformação das células com o vetor pGADT7 vazio e PGBK7-CathL, e pGBKT7 vazio e as construções pGADT-CclemCPI-1 ou pGADT7-CsinCPI-2, para verificar possíveis interações falso-positivas. As células de levedura transformadas foram plaqueadas em meio SD sólido sem Leu e Trp (meio *Double Dropout*, DDO), também em DDO na presença de 40 mg/L de X α -Gal (DDO/X). As placas foram examinadas após 4 dias de incubação a 30°C.

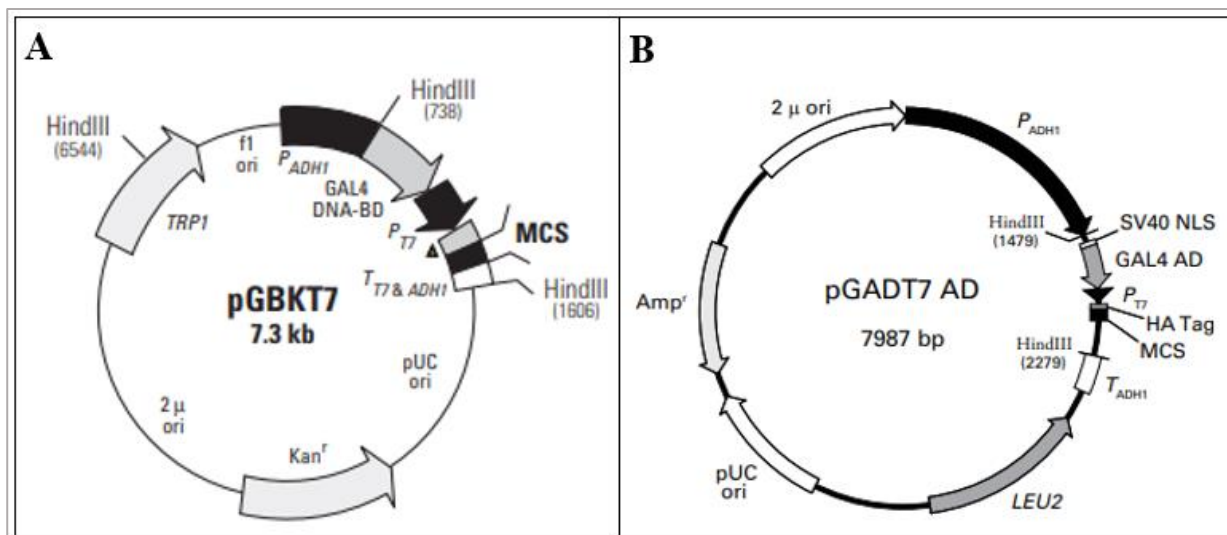


Fig. 33 – Vetores de expressão para Yeast two-hybrid. A: o vetor pGBKT7 contém um fragmento do domínio de ligação ao DNA de GAL4 (DNA-BD). **B:** o vetor pGADT7 AD é adequado para expressar uma proteína alvo em fusão ao domínio de ativação (AD) GAL4. Fonte: Takara Bio.

Tabela 3: Sequência de primers para Y2H

Primer	Sequência	Tamanho do amplicon (pb)
pGB_CathL-F	5'CATGGAGGCCGAATTCATGTCATTTGAGGATCTTGTCAAA3'	998 pb
pGB_CathL-R	5'GCAGGTTCGACGGATCCCTACACCAGAGGGAAGCTAGCAGA3'	
pGA_CPI2-F	5'GGAGGCCAGTGAATTCATGGCTACTGTTGGTGGTGTACGT3'	335 pb
pGA_CPI2-R	5'CGAGCTCGATGGATCCCTTAAGCGGTGCTGGAGTGAGACTG3'	
pGA_CPI1-F	5'GGAGGCCAGTGAATTCATGTATGATCGTTTAGTGGGAGGG3'	359 pb
pGA_CPI1-R	5'CGAGCTCGATGGATCCCTCACTCGGAAGGGGCAAATTTAAG3'	

Primers usados no processo de clonagem molecular das cistatinas CclemCPI-1 e CsinCPI-2 e DcCathL nos vetores pGADT7 e pGBKT7. As regiões sublinhadas indicam os sítios de restrição para *Eco* RI (GAATTC) e *Bam* HI (GGATCC). Fonte: elaborado pela autora.

3.3 Isolamento de RNA e síntese de cDNA de *D. citri* infectados ou livres de CLas

O RNA total foi extraído de um *pool* de cinco *D. citri* adultos usando TRIzol (Invitrogen, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, e sua integridade foi analisada pelo padrão de rRNA em gel de agarose a 1%, enquanto a pureza foi verificada pelas razões de absorvância em A260/A280 e A260/A230 obtidas em espectrofotometria UV/Vis com Biodrop Duo (Biochrom., Reino Unido). A síntese de cDNA foi realizada com o First Strand cDNA Kit (Applied Biosystems, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.4 PCR quantitativa (qPCR) de genes correspondentes às catepsinas DcCathB e DcCathL de *D. citri* infectados ou livres da bactéria CLas

A PCR quantitativa foi realizada no sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Waltham, EUA) usando Power Up™ SYBR Green Master Mix (2x) (Applied Biosystem, Waltham, EUA) com os pares de primers DcCathB-F/DcCathB-R para DcCathB (XM_026822908.1), DcCathL-F/DcCathL-R para DcCathL (MN166228.1) e GAPDH-F/GAPDH-R para GAPDH (XM_008481619.1) como gene de referência (Tabela 4) (Bassan et al, 2017). A reação do SYBR green master mix foi realizada em uma mistura de reação de 15 µL contendo 6 µL de SYBR green (Applied Biosystem, Waltham, EUA), 1 µL de cada primer, 1 µL do modelo de cDNA apropriado e 6 µL de água. A reação de qPCR foi realizada da seguinte forma para DcCaths: 50 °C por 2 min e 95 °C por 2 min; 40 ciclos a 95 °C por 20 s; 60 °C por 30 s. Após o ciclo final de PCR, foi feita uma análise da curva de *Melting* para determinar a especificidade da reação, incubando a reação a 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min, 95 °C por 15 s e 60 °C por 15 s. Cada amostra foi testada em duplicatas.

Tabela 4: Sequência de primers para avaliação da expressão gênica

Primer	Sequência	Tamanho do amplicon (pb)
DcCathL-F	5' CCACCATTGGACCCGTATCT 3'	85 pb
DcCathL-R	5' TCAGGCTCGTAGTACACACC 3'	
DcCathB-F	5'CTGGACGAATCAGACGAGGA3'	120 pb
DcCathB-R	5'AGCCCATGGTTTCCAGATCA 3'	
GAPDH-F	5' GACTCACTCCTCCATCTTT3'	96 pb
GAPDH-R	5' GTATCCGTACTIONCGTTGTCATACC 3'	

Primers usados para avaliação da expressão gênica de DcCathL e DcCathB em insetos *D. citri* por meio de qPCR. GAPDH foi utilizado com gene de referência para normalizar a expressão gênica avaliada de acordo com Bassan e colaboradores (2017). Fonte: elaborado pela autora.

3.5 Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) para avaliação da expressão gênica de *DcCathB* e *DcCathL* na presença e ausência da bactéria CLas

Os adultos de *D. citri* foram coletados de colônias CLas + e CLas - e, em seguida, foram imobilizados por 20 minutos no gelo e os tecidos de interesse foram dissecados (Figura 34; Apêndice II) em solução salina tamponada com fosfato (PBS, 1x, pH 7,4).

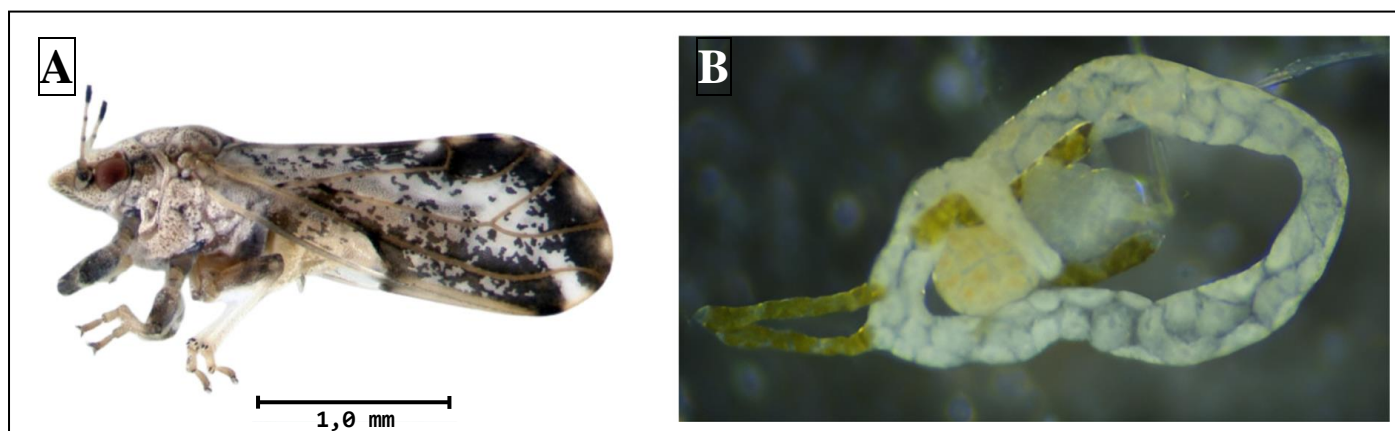


Fig. 34- Dissecação do intestino médio de *Diaphorina citri* visto ao estereomicroscópio. **A:** inseto *D. citri* adulto; **B:** intestino médio dissecado e visualizado em microscópio. Fonte: Imagem do inseto adulto, IFAS; imagem da microscopia do intestino elaborada pela autora.

O PBS foi removido dos tecidos após a dissecação e imediatamente adicionados 300 µl de fixador Carnoy (clorofórmio: etanol: ácido acético glacial, 6:3:1), e os tecidos foram fixados por 5 minutos. Após a fixação, as amostras foram hibridizadas durante a noite, no escuro, em 1 mL de tampão de hibridização (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,9 M NaCl, 0.01% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 30% de formamida) contendo 10 pmol de sonda fluorescente DcCathB ou DcCathL (Tabela 5) em uma pequena câmara úmida adaptada. Após a

hibridização, os intestinos foram transferidos com uma agulha apropriada para uma lâmina de microscópio nova, e as amostras coradas foram montadas com DAPI (Southern Biotech, Birmingham, EUA) e visualizadas no microscópio confocal multifotônico Leica SP8 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). A amostra sem sonda foi usada como controle negativo (Kliot et al., 2014).

Tabela 5: Sondas utilizadas no ensaio de FISH

Sonda	Sequência
Cy3-DcCathB	5'AGCCCATGGTTTCCAGATCA 3'
Cy5-DcCathL:	5' TCAGGCTCGTAGTACACACACC 3'

Sequência das sondas utilizadas para a localização dos transcritos de DcCathB e DcCathL em *D. citri*. Fonte: elaborado pela autora.

3.6 Imunolocalização da proteína DcCathL em tecidos dissecados de *D. citri*

Um anticorpo policlonal específico para a enzima DcCathL foi utilizado para localizar a proteína DcCathL em órgãos de *D. citri*. Os insetos de *D. citri* foram imobilizados e dissecados em PBS (1x) da mesma forma como descrito acima. Assim, o intestino, ovário ou o par de glândulas salivares foram dissecados (Figura 35) e fixados por 40 minutos em paraformaldeído 4%, lavados três vezes com PBS 1x, depois permeabilizado com Triton X-100 (0,1%) por 20 minutos em temperatura ambiente, lavado em PBS+Tween20 (PBST) e bloqueado durante a noite com PBST contendo 1% de BSA, a 4 °C. Os órgãos foram incubados em um tampão de bloqueio (PBST+1% de BSA) contendo o anticorpo DcCathL em uma diluição de 1:50, por 2 horas em temperatura ambiente. Foram realizadas três lavagens de 5 minutos em PBST e subsequente incubação em um tampão de bloqueio contendo o anticorpo anti-rabbit conjugado com Alexa Fluor™ 568, na diluição de 1:250 (Invitrogen), por 2 horas em temperatura ambiente, no escuro. As amostras foram enxaguadas novamente três vezes em PBST, e os órgãos foram transferidos para lâminas de microscópio, corados com DAPI e visualizados em microscópio confocal multifotônico Leica SP8 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) (Martins e Bitondi, 2012)



Fig. 35- Dissecação de ovário, glândulas salivares e intestino médio de *Diaphorina citri* visto ao estereomicroscópio. Na parte superior, o inseto *D. citri* adulto; na parte inferior os três tecidos utilizadas na imunolocalização de DcCathL, sendo à esquerda o ovário, no meio o par de glândulas salivares (indicado pelas setas amarelas), e à direita, o intestino médio. Fonte: elaborado pela autora.

3.7 Predição *in silico* da localização subcelular das proteínas DcCathB e DcCathL

As sequências de aminoácidos correspondentes às enzimas DcCathB e DcCathL (Tabela 6) foram analisadas *in silico* através do *software online* Protter. Através desse software, uma hipótese por meio da visualização de características de sequências anotadas e dados proteômicos experimentais no contexto da topologia de proteínas foi gerada (Omasits, et al., 2014).

Tabela 6 – Sequência de aminoácidos das catepsinas de *D. citri* DcCathB e DcCathL

Sequência de aminoácidos DcCathB
MMVLSVILVSIILSLTLDVHANHVDFLSDEYIDSLNKQGLSWTAGRNFAADLTPADV ERMFGPRPPHQGFPEYPAPSERRSYRGGGLNAAPSFPPFDAREHFKSCAPIISVVPNQG ACASSYVSIADVVPQTSDHQWEVVSLLHLLVRKDQSLQLLLHHFQDLGAVLLALALDA AAVTEGAHGGENLQEENVSYEQAYHYDPIDNYITESTWVWVHKRGLVTGGAHHSN TGCQPVSFPPCNHANYTTSEPECKTLATPQPKCHTRCTNDNYGRGFFQDKYRFKRY WVNDEVADIQQEIMKNGPVVANMYLYSDIFSYSKSGKYGNPVPVANMYLYSDIFS SGVYAVSASAEIVAYATVKLIGWGEENGRPYWTIVSTFGEQFGDKGTIKILRGRNEAI IESLVNGALPKDNYGVEFGESGERLSEFGVRAESSEEFRENGEEE*
Sequência de aminoácidos DcCathL
MKLYFLPLLLTAVAAVSFEDLVKEEWKTFKLTHGKKYESDIEENFRLKIYMENKRRI AQHNAYYESGKVSFKLDMNHFGDMLHHEFVHMMNGFKRSTRLLGTERVEEGVTYI APDNVKLPEEVDWRNKGAVTPIKDQGCQSCWAFSTTGALEAQHFRKTGNLVSLS QNLIDCSGKYGNQGCNGGMMDQAFQYIKDNHGIDTESSYPYEAMDDNCRYKRAKS GAVDRGYVDIPEGDEYKLKAAVATIGPVSIAIDASHQSFQFYSEGVYVEPECNSTQLD HAVLVVGYGTDENGNDYWLVKNSWNTTWGDEGYIEMARNRENNCGVASSASFPL V*

DcCathB com uma sequência de 445 aminoácidos. Sequência de 336 aminoácidos para DcCathL.

A análise foi repetida para as mesmas sequências (Tabela 6) de proteínas utilizando o *software online* “DeepLoc 2.0” para gerar a predição da localização subcelular das proteínas, baseada em sequência de proteínas presentes no UniProt (Thumuluri et al., 2022). A multilocalização proteica retornada pela ferramenta DeepLoc se baseia em um valor de *threshold* pré-estabelecido no *software* (Anexo I).

3.8 Produção de CclemCPI-1 e CsinCPI-2 recombinantes para teste em dieta artificial de *D. citri*

Os genes *CclemCPI-1* e *CsinCPI-2* (Schneider et al., 2020) e GFP, que codificam para as cistatinas de citros *CclemCPI-1* e *CsinCPI-2*, como *Green Fluorescent Protein* (GFP), foram clonados independentemente no vetor de expressão pET28a (Novagen), previamente em nosso grupo de pesquisa, e os plasmídeos recombinantes pET28a-CclemCPI-1, pET28a-CsinCPI-2 e pET28a-GFP, foram transformados em células NiCo21 (DE3) competentes de *E. coli* (New England BioLabs, Ipswich, MA). A expressão recombinante e a purificação por cromatografia de afinidade das proteínas *CclemCPI-1*, *CsinCPI-2* e GFP foram realizadas conforme descrito anteriormente (Leguizamón et al., 2019; Schneider et al., 2020). Resumidamente, as células bacterianas foram cultivadas a 37 °C, 200 rpm até uma densidade óptica de 0,4-0,6 a 600 nm e, em seguida, foi adicionado isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Sigma-Aldrich) a 0,4

mM na cultura, e a expressão foi induzida por 4 h. As proteínas recombinantes contendo His-tag foram purificadas usando Ni-NTA Superflow Resin (Qiagen, Valencia, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Os resultados da expressão heteróloga foram verificados por SDS-PAGE 15%, conforme descrito em Laemmli (1970). As frações purificadas foram dialisadas em tampão PBS 0,1x (pH 7,4). A quantificação da proteína total foi realizada com o Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA).

3.9 Ensaio de eclosão de ovos de *D. citri* na presença e ausência de cistatinas recombinantes

Para avaliar a eclosão dos ovos de *D. citri* em um ambiente artificial, foi preparado um meio artificial de eclosão de ovos (corantes alimentares amarelo (0,8%) e verde (0,2%), sacarose (50%), 2,8 g de gelatina em pó (Knox®) e extrato de levedura (2%) para 20 mL de água miliQ) baseado em Santos-Ortega e Killiny (2020), com pequenas modificações. O meio artificial foi então vertido em duas placas de Petri de 35 mm de diâmetro e 1 cm de altura (5 ml por placa) e resfriado por 15 minutos. As placas de Petri com o meio foram refrigeradas a 4 °C até o uso. Como controle, foi usado PBS 0,1x. Para testar os efeitos da proteína cistatina na eclosão de ovos, foi adicionado 0,88 mg/mL de CsinCPI-2 no meio de eclosão na proporção de 1:1 (v/v) e, deste modo, a concentração final da proteína no meio era de 0,44 mg/mL. Independentemente, nas mesmas proporções preparou-se as placas controle, que consistiram na adição do meio para eclosão e do PBS 0,1x na proporção 1:1. Um total de 60 ovos saudáveis de *D. citri* foram coletados dos brotos de *C. macrophylla* (Figura 36A). Os ovos foram colocados nas placas contendo os meios de cultura em duas réplicas com 15 ovos em cada (Figura 36B), totalizando 30 ovos para cada grupo (controle e CsinCPI-2). Foi realizada a observação para confirmar a eclosão de ninfas de primeiro instar em meio artificial diariamente durante 72h.

É possível ver os ovos com ampliação em um estereomicroscópio após serem colocados no meio de eclosão (Figura 36C).

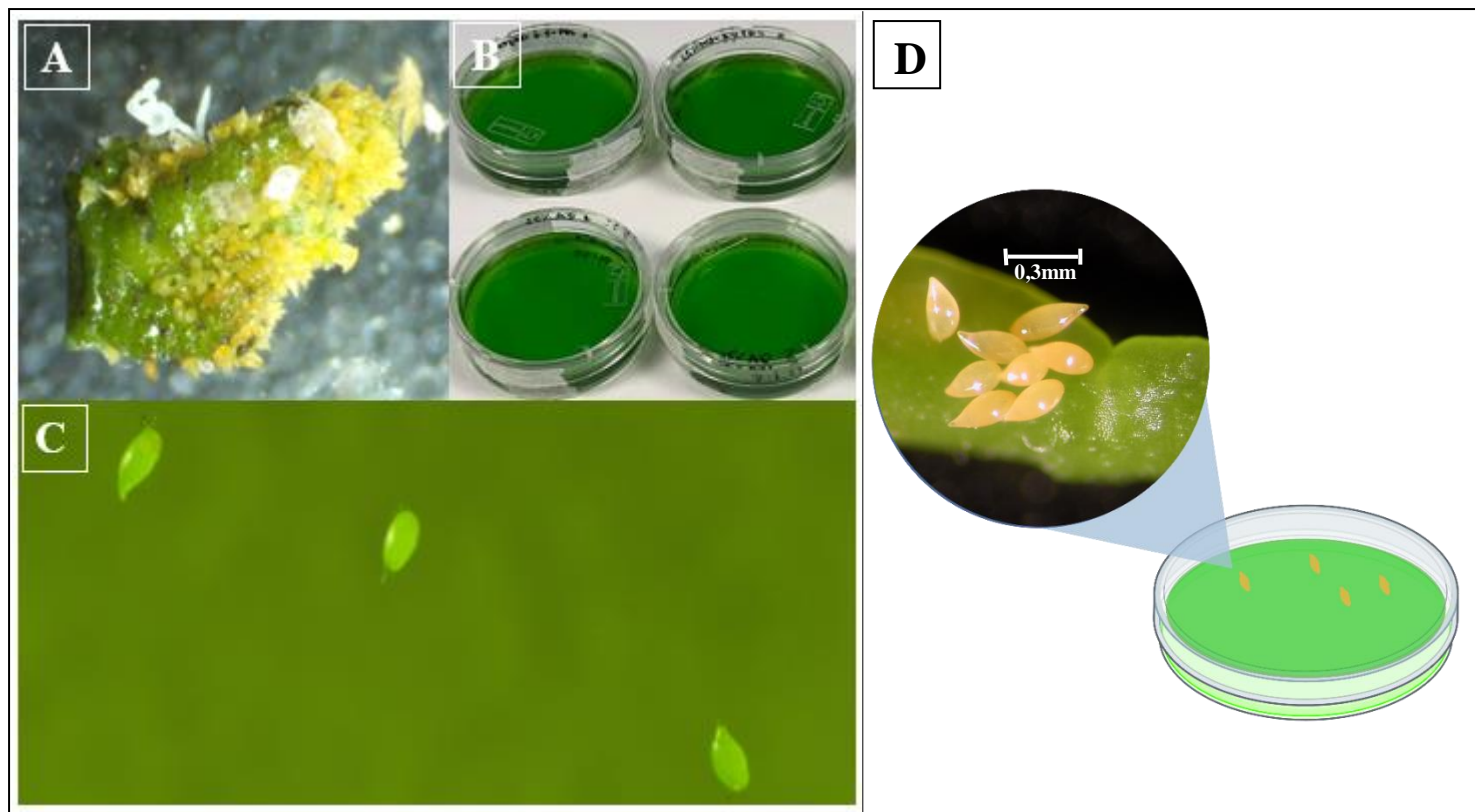


Fig. 36– Ovos em incubação artificial para teste de eclosão **A:** Ovos de *D. citri* aderidos ao broto de *C. macrophylla*; **B:** 4 placas de Petri contendo um meio de dieta artificial. Na parte superior temos o primeiro tratamento contendo a dieta artificial + 1X PBS. Na parte inferior, temos apenas o meio de dieta artificial + CsinCPI-2. Em cada réplica, 15 ovos ACP. **C:** Ovos de *D. citri* depois de transferidos para o meio de dieta artificial visualizados com zoom no microscópio. **D:** Representação da disposição de ovos na placa contendo meio artificial e, de forma ampliada, visão dos ovos de *D. citri* caracteristicamente de cor alaranjada brilhante, com afinamento de suas extremidades com uma medida média dos ovos deste inseto de 0,3 mm. Fonte: elaborado pela autora.

3.10 Bioensaio para alimentação de ninfas de *D. citri* em dieta artificial utilizando membranas de Kimwipes®

Para avaliar os efeitos das proteínas CsinCPI-2 e CclemCPI-1 contra ninfas de *D. citri*, foi realizado um bioensaio de alimentação artificial usando um método adaptado de alimentação em Kimwipes® (lenços comumente usados em microscopia) dobrados, baseado em Tavares e Bonning (2022) com algumas modificações (Figura 37A). Foi testado, de forma independente, populações de insetos infectados pela bactéria CLas e saudáveis, para uma avaliação comparativa entre tais grupos. Usando esse modelo de ensaio de dieta artificial para as ninfas, primeiro os lenços *Kimtech Science Kimwipes®* (Kimberly-Clark, Irving, TX, EUA) foram autoclavados, dobrados em metades iguais quatro vezes e cortados. Assim, foram obtidos 8 pedaços quadrados de tamanhos iguais. Posteriormente, esses quadrados foram arredondados

para se adequarem em uma miniplaca de Petri (35 mm x 12 mm). Uma solução de sacarose (15%) em água estéril contendo 0,1% de corantes alimentícios verde e 0,4% amarelo (McCormick®) foi preparada com CsinCPI-2 (concentração final de 440 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para testar os efeitos inibidores contra o psilídeo, e uma dieta de sacarose (15%) contendo tampão PBS (0,1x) foi usada como controle no experimento. Independentemente, 700 μL de cada solução de dieta artificial de cada tratamento (CsinCPI-2 ou PBS 0,1x) foram aplicados na superfície dos lenços dobrados a uma taxa final de $\sim 73 \mu\text{L}/\text{cm}^2$. A configuração do bioensaio com Kimwipes realizados para alimentação de ninfas pode ser visualizada esquematicamente na Figura 37A.

A avaliação do bioensaio foi feita com três réplicas técnicas contendo 11 insetos para cada uma. O experimento foi repetido para um total de quatro réplicas biológicas, exceto para a proteína CclemCPI-1, que foi testada em uma única réplica técnica. A avaliação durou 72 horas, e a mortalidade foi registrada diariamente em cada grupo (PBS como controle, e proteína-alvo CsinCPI-2). Uma solução de sacarose a 15% preparada da mesma maneira em H_2O estéril, corante verde (0,1%) e amarelo (0,4%) (McCormick®), foi preparada com a proteína recombinante GFP (822,91 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e, após o período de alimentação, o intestino médio desses insetos foram dissecados, conforme já descrito, e avaliados em microscópio confocal multifotônico Leica SP8 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). A proteína GFP foi usada para validar a capacidade de uma proteína recombinante ser absorvida pelos insetos no processo de alimentação nesse método de dieta artificial.

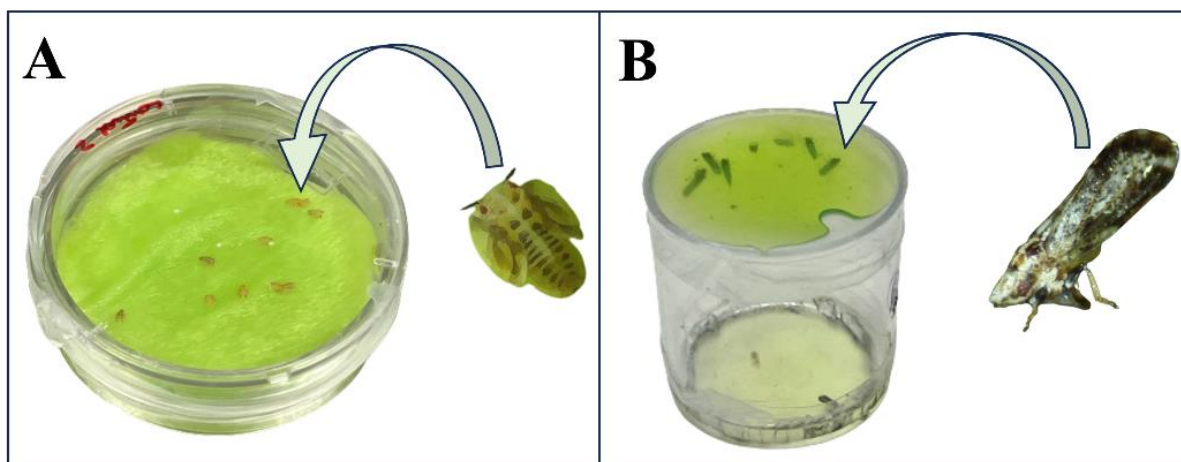


Fig. 37- Representação esquemática da dieta artificial para *D. citri*. A: Ensaio de “Kimwipes” para alimentação de ninfas de 4-5º instar de *D. citri*. B: Bioensaio de dieta artificial disponibilizada em sachês de parafilme para *D. citri* adultos. Fonte: elaborado pela autora.

3.11 Bioensaio de alimentação com sachê de parafilme para adultos de *D. citri* na presença e ausência das cistatinas

Os efeitos da proteína CsinCPI-2 contra *D. citri* adultos foram determinados usando o método de alimentação com sachê de parafilme (Figura 37B). Foram usados tubos plásticos com dimensões de 2,5 cm de diâmetro \times 2,5 cm de altura. Foram realizadas três réplicas técnicas de CsinCPI-2, em uma concentração final de 440 $\mu\text{g/ml}$, em solução de sacarose a 15% e três réplicas incluindo solução de sacarose a 15% e tampão PBS, e uma réplica técnica foi realizada para avaliar os efeitos das proteínas CclemCPI-1 e CsinCPI-2. Dez adultos foram cuidadosamente transferidos para cada tubo e a parte superior foi coberta com uma membrana de parafilme. A solução foi aplicada na parte superior (250 μL), e uma segunda membrana de parafilme foi esticada para segurar e permitir a distribuição uniforme da solução dentro do sachê (Figura 37B) (Galdeano et al., 2017). Os corantes adicionados ao alimento artificial servem para assegurar que eles estão se alimentando, já que a produção de *honeydew* comumente branca tem sua cor alterada quando os insetos se alimentam da dieta artificial (Apêndice V). Os tubos foram mantidos sob luz a 25 ± 2 °C, 50 ± 5 % de umidade relativa com um ciclo claro-escuro de 14 h:10 h. A mortalidade foi registrada diariamente durante 72 h de avaliação.

3.12 Análise estatística

A análise da diferença da expressão gênica de DcCathL em psilídeos CLas - e CLas + foi determinada usando o teste T, e o valor de p foi ajustado com a correção de Bonferroni. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar a eclosão de ovos em ambiente artificial, comparando a diferença do grupo controle com àquele contendo a proteína, CsinCPI-2. Além disso, as diferenças significativas na mortalidade entre CclemCPI-1, CsinCPI-2 e o grupo de controle em função do tempo para *D. citri* saudável e infectada foram determinadas usando a regressão de riscos proporcionais de Cox. As suposições de normalidade de cada amostra foram verificadas antes da realização da regressão de Cox ou do teste T pelo teste de Shapiro-Wilk, e todas as análises foram realizadas no RStudio (v. 2023.6.2.561).

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio Y2H

As ORFs de DcCathL, CclemCPI-1 e CsinCPI-2 foram amplificadas por PCR usando primers específicos (Tabela 3), e os amplicons são mostrados na figura abaixo (Figura 38).

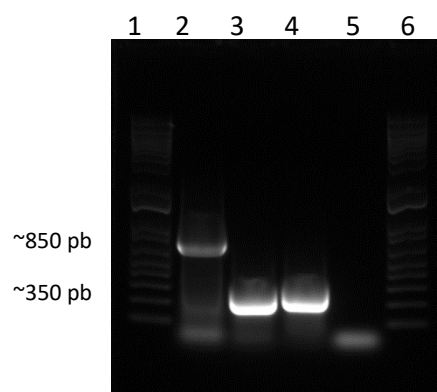


Fig. 38– Produtos de PCR usando os primers específicos para Y2H, visualizados em gel de agarose a 1%. 1: 1Kb Plus DNA Ladder; **2:** amplicon DcCathL (998 pb); **3:** amplicon CsinCPI-2 (359 pb); **4:** amplicon CclemCPI-1 (335 pb); **5:** controle negativo; **6:** 1 Kb Plus DNA Ladder. Fonte: elaborado pela autora.

Esses produtos de amplificação (Figura 38) e os vetores pGBKT7 e pGADT7 foram purificados do gel de agarose e duplamente digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Eco* RI (Figura 35), novamente purificados e aplicados no gel de agarose e recuperados por excisão e purificação do DNA de acordo com as instruções do fabricante (QIAquick® gel Extraction Kit - Qiagen). Abaixo pode ser visto os fragmentos de DNA e os vetores após a restrição com as enzimas *Bam* HI e *Eco* RI (Figura 39).

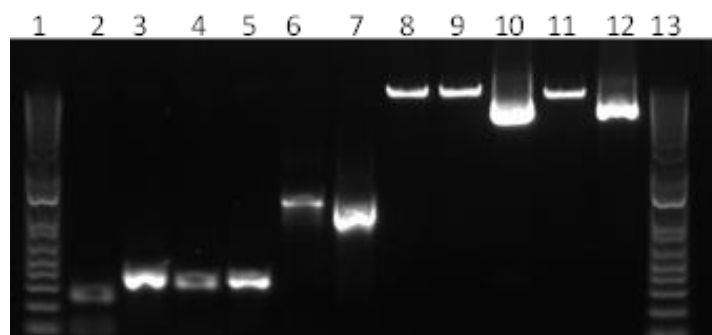


Fig. 39 - Dupla digestão dos fragmentos de cistatinas e catepsinas e dos vetores pGADT7 e pGBKT7. 1: 1kb DNA ladder; **2:** CclemCPI-1 pós digestão; **3:** CclemCPI-1 não digerido; **4:** CsinCPI-2 pós digestão; **5:** CsinCPI-2 não digerido; **6:** DcCathL pós digestão; **7:** DcCathL não digerido; **8:** vetor pGADT7 digerido, 1; **9:** vetor pGADT7 digerido, 2; **10:** vetor pGADT7 não digerido; **11:** vetor pGBKT7 digerido; **12:** vetor pGBKT7 não digerido; **13:** 1kb DNA ladder. Fonte: elaborado pela autora.

Após a clivagem dos DNAs alvos, procedimentos de clonagem molecular em vetores apropriados para Y2H foram realizadas separadamente, com os seguintes pares: pGADT7

+ClemCPI-1, pGADT7 + CsinCPI-2, e pGBKT7 + DCcathL, e a integridade dessas construções foram confirmadas por sequenciamento de DNA (Figura 40).

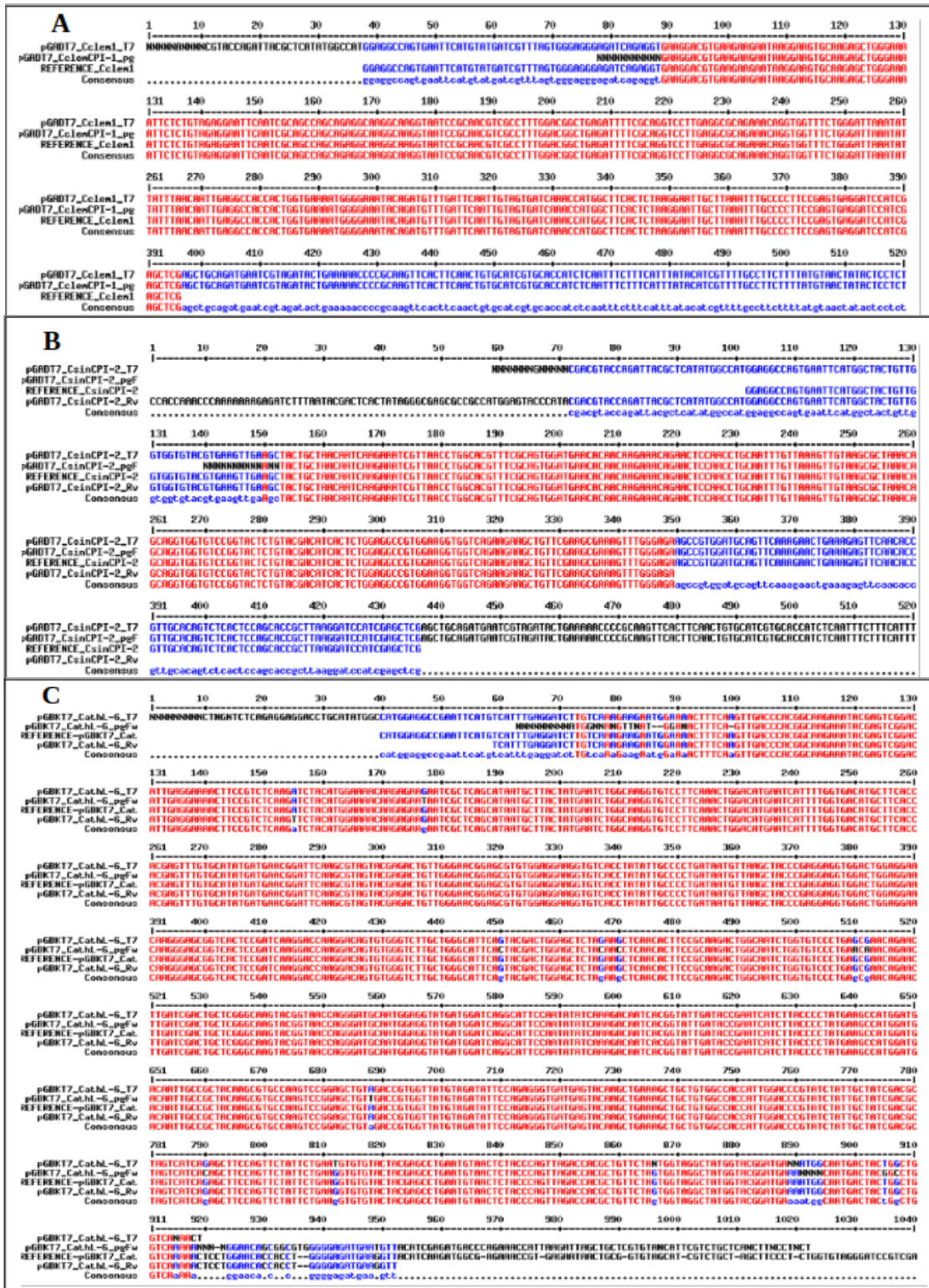


Fig. 40 – Multialinhamento do sequenciamento de DNA das construções de Y2H. A: alinhamento entre o resultado do sequenciamento da construção pGADT7_ClemCPI-1 e a sequência *ClemCPI-1* de referência; B: alinhamento entre o resultado do sequenciamento da construção pGADT7_CsinCPI-2 e a sequência *CsinCPI-2* de referência; C: alinhamento entre o resultado do sequenciamento da construção pGBKT7_CatM e a sequência *DcCathL* de referência. Fonte: elaborado pela autora.

As construções Y2H (Figura 40), bem como os controles negativo (pGBKT7-Lam + pGADT7) e positivo (pGBKT7-53 + pGADT7), foram cotransformadas em células de *S. cerevisiae* (Y2HGold) em placas contendo DDO e DDO/X. As colônias transformantes podem ser vistas abaixo (Figura 41).

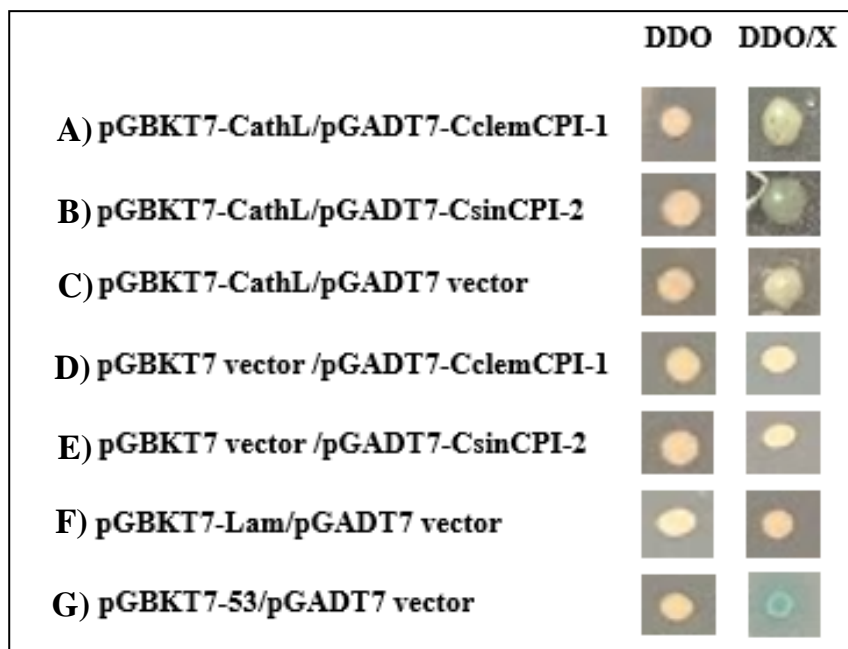


Fig. 41- Colônias transformantes após ensaio de Y2H. Colônias de transformantes crescidas em meio DDO e DDO/X mostrando as possíveis interações proteína-proteína. Fonte: elaborado pela autora.

Como podemos ver, a combinação das construções contendo DcCathL e CclemCPI-1 (Figura 41A) ou DcCathL e CsinCPI-2 (Figura 41B) apresentou uma cor levemente azulada no meio DDO/X, sugerindo uma interação entre essas proteínas. O controle negativo (vetor pGBKT7-Lam/pGADT7) apresentou uma cor branca no meio DDO/X (Figura 41F) e o controle positivo (vetor pGBKT7-53/pGADT7) uma cor azul no meio DDO/X (Figura 41G), o que significa que o processo de cotransformação foi realizado com sucesso. No entanto, uma cor azulada foi encontrada na combinação do vetor pGBKT7-CathL/pGADT7 (Figura 41C), mas não na combinação do vetor pGBKT7/pGADT7-CclemCPI-1 e do vetor pGBKT7/pGADT7-CsinCPI-2 (Figura 41D, E), possivelmente, indicando que uma interação falso-positiva foi detectada no teste da interação entre a catepsina DcCathL e as cistatinas, CclemCPI-1 e CsinCPI-2. Dessa forma, podemos inferir que provavelmente a construção gênica contendo a ORF de DcCathL (pGBKT7-CathL) está causando a interação falso-positiva, requerendo ajustes (Figura 41).

4.2 Análise da expressão gênica por qPCR e FISH para populações de *D. citri*

CLas - e CLas +

A expressão dos genes *DcCathB* e *DcCathL* foi avaliada por qPCR e FISH, ambos contendo como amostras *D. citri* infectadas ou não infectadas pela bactéria CLas. A análise de qPCR mostrou uma maior expressão relativa de *DcCathB* (*upregulated*) em insetos livres de CLas, contrastando com uma expressão menor (*downregulated*) encontrada em insetos infectados pela bactéria. Por outro lado, a expressão relativa de *DcCathL* é menor (*downregulated*) em insetos livres de CLas, contrastando com a expressão do gene que se mostrou aumentada (*upregulated*) nos insetos infectados (Figura 42).

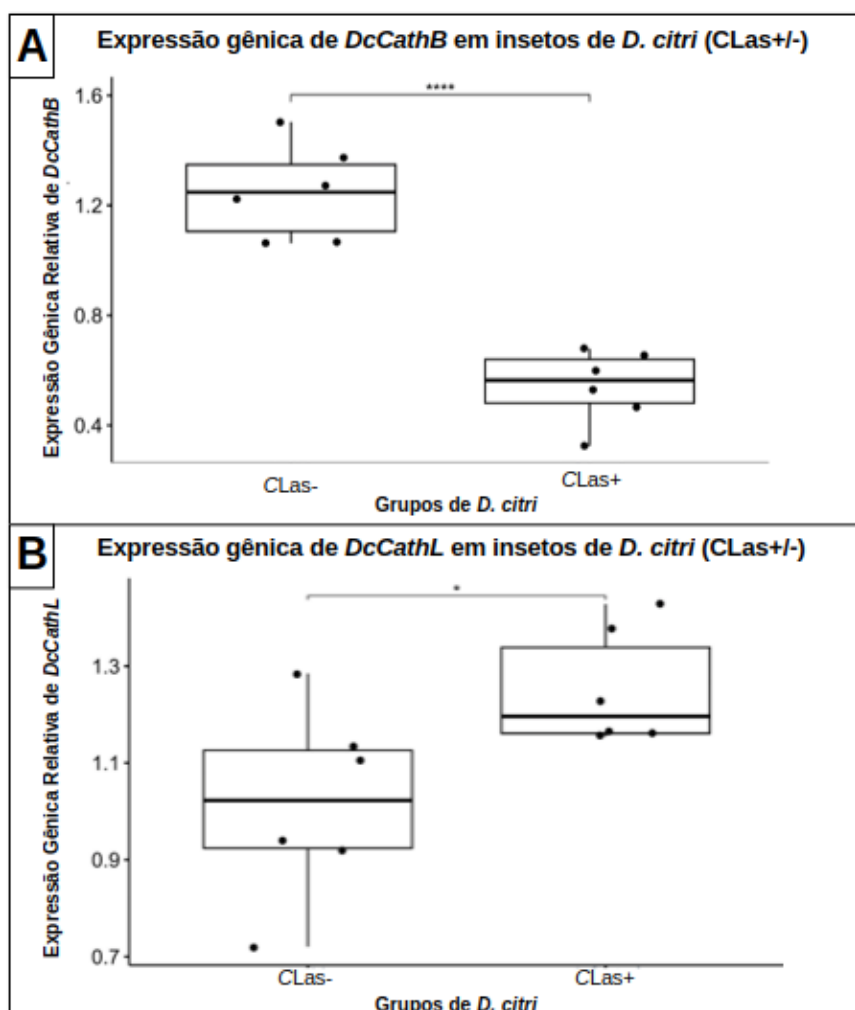


Fig. 42 - Expressão relativa dos genes *DcCathB* e *DcCathL* da análise de *D. citri* saudável (CLas -) e infectado (CLas +) por RT-qPCR. Os dados foram normalizados usando o gene de referência GAPDH de *D. citri*. Os níveis de expressão relativa foram calculados usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). A análise estatística e o gráfico foram realizados com o software RStudio (v. 2023.6.2.561). As diferenças significativas são indicadas por **** ($p < 0,0001$) e * ($p < 0,05$), respectivamente. Fonte: elaborado pela autora.

O ensaio de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) foi realizada e mostrou a distribuição espaço-temporal de transcritos de *DcCathB* e *DcCathL* nas células intestinais de *D. citri* (CLas + ou CLas -). Os resultados da expressão dos genes *DcCathB* e *DcCathL* obtidos com a técnica de qPCR para insetos adultos, são similares à expressão espaço-temporal encontrada em intestinos de *D. citri* quando analisados por FISH (Figura 42, 43 e 44). Foi possível observar a coloração azul dada pela marcação por DAPI nos núcleos celulares colocalizando com os transcritos de *DcCathB* ou *DcCathL* nas células intestinais do inseto (Figura 43 e 44). Uma fluorescência significativa resultante da excitação de Cy3 na hibridização da sonda Cy3-*DcCathB* foi encontrada em intestinos de insetos livres de bactéria, mas nenhuma fluorescência significativa foi detectada em intestinos infectados com CLas (figura 43). O oposto foi observado na avaliação de *DcCathL*, em que uma fluorescência significativa foi observada apenas no intestino de insetos infectados por CLas (Figura 44) devido à excitação de Cy5 presente na sonda hibridizada Cy5-*DcCathL*.

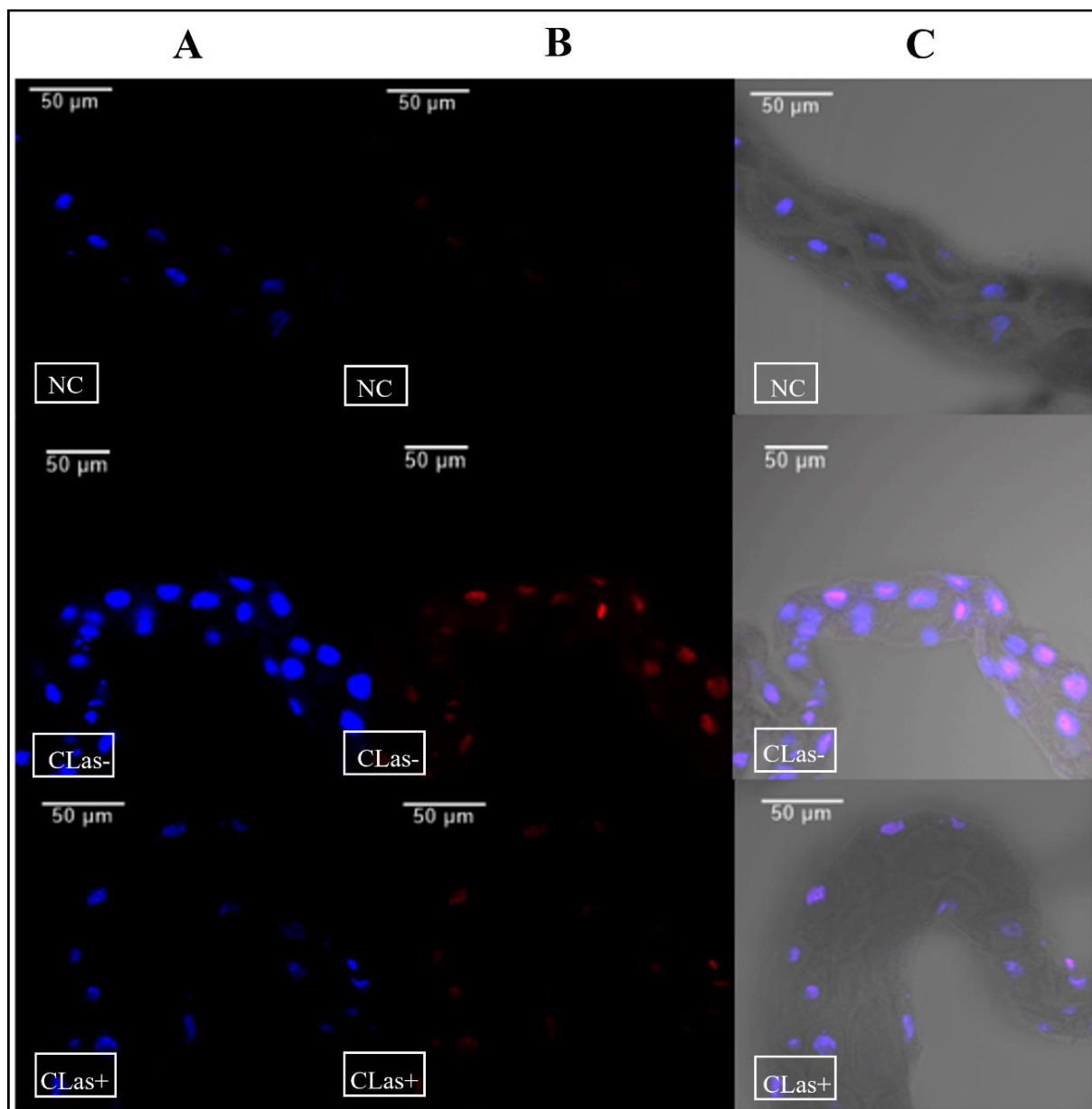


Fig. 43- Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) para detectar transcritos de DcCathB em tecidos intestinais dissecados de *Diaphorina citri* saudável (CLas -) e infectado (CLas +). A: DAPI corando os núcleos das células intestinais (azul); B: sonda DcCathB-Cy3 marcando os transcritos-alvo nos núcleos das células intestinais (vermelha); C: imagem sobreposta; NC: controle negativo. A barra de escala representa 50 μm. Observação em microscópio confocal com aumento de 40x. Fonte: elaborado pela autora.

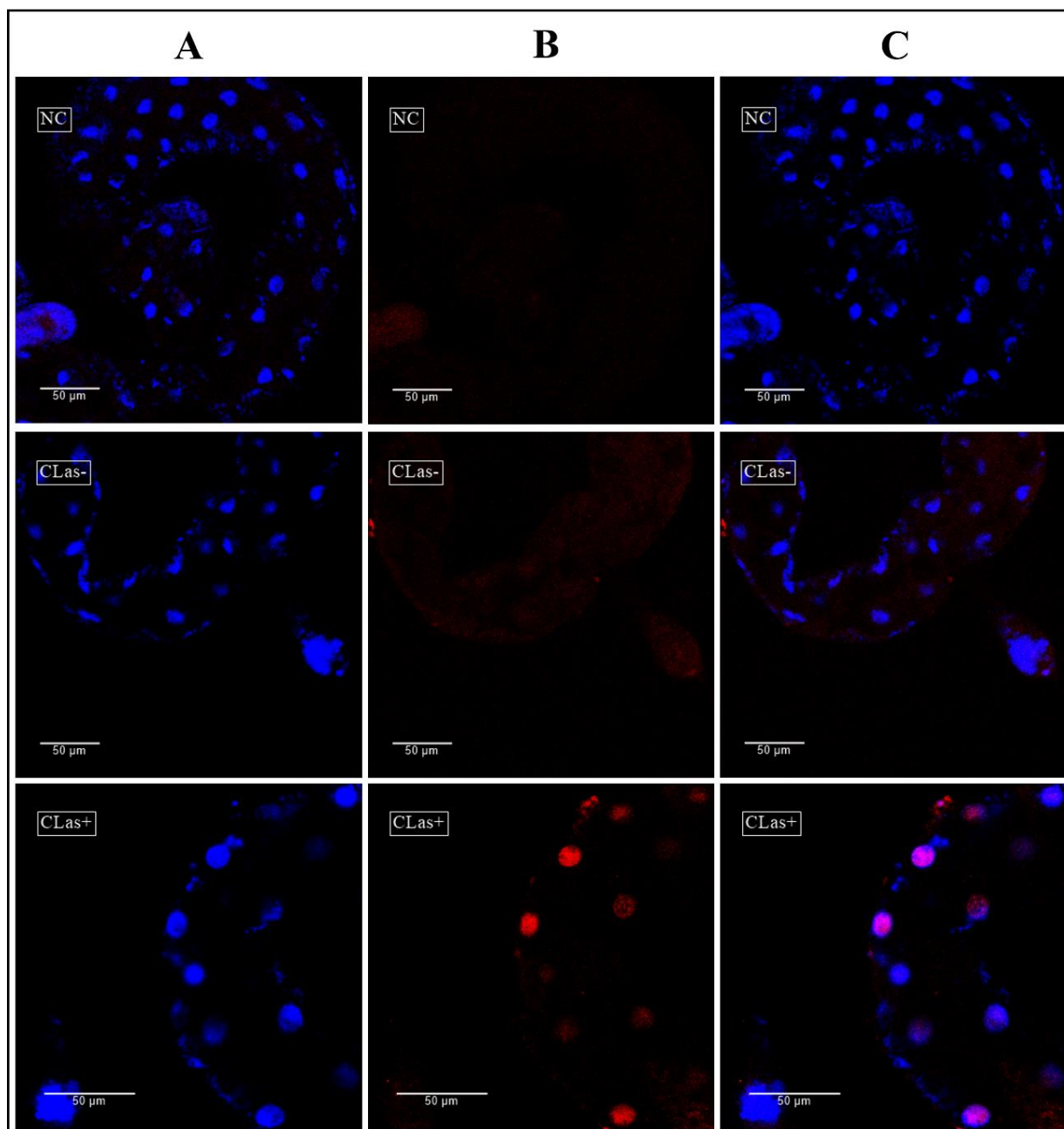


Fig. 44- Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) para detectar transcritos de DcCathL em tecidos intestinais dissecados de *Diaphorina citri* saudável (CLas -) e infectado (CLas +). A: DAPI corando os núcleos das células intestinais (azul); B: sonda DcCathL-Cy5 marcando os transcritos-alvo nos núcleos das células intestinais (vermelha); C: imagem sobreposta; NC: controle negativo. A barra de escala representa 50 µm. Observação em microscópio confocal com aumento de 40x. Fonte: elaborado pela autora.

4.3 Imunolocalização da proteína DcCathL em tecidos dissecados de *D. citri*

A imunolocalização foi utilizada para visualizar a localização da proteína DcCathL no intestino médio, ovário e glândulas salivares de insetos de *D. citri* livres ou infectados por CLas (Figuras 45, 46 e 47). O maior sinal da proteína DcCathL foi observado no intestino médio de *D. citri*, em comparação com os demais tecidos avaliados (Figura 45). Foram observados sinais de fluorescência mais abundantes, indicando a presença da proteína DcCathL, nos tecidos intestinais e ovariano infectados em comparação com esses tecidos livres de CLas (Figura 45 e 46). Não se observou até o momento, diferença significativa na expressão de DcCathL em tecidos de glândulas salivares infectados ou livres de CLas (Figura 47). Os controles negativos foram incubados com Alexa Flúor-568 e não foi detectado qualquer sinal. A proteína DcCathL se mostrou mais concentrada na zona periférica à membrana das células (Figuras 44, 45 e 46; Apêndice III e IV).

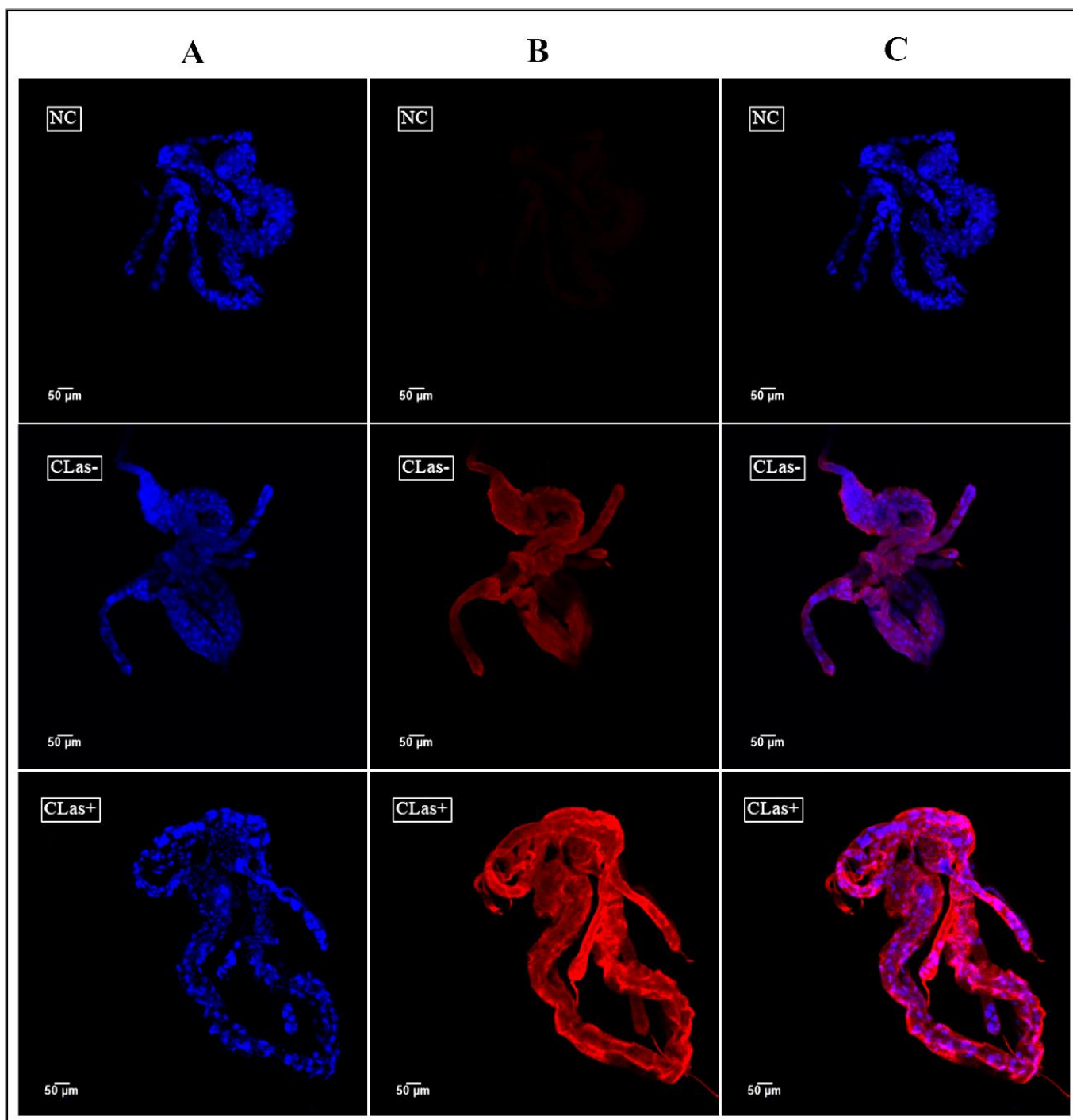


Fig. 45- Imunomarcção para detectar a proteína DcCathL em tecidos intestinais dissecados de *Diaphorina citri* saudável (CLas -) e infectado (CLas +). **A:** DAPI (azul) corando os núcleos das células intestinais; **B:** anticorpo DcCathL + Alexa flúor-568 (vermelho) marcando a proteína alvo nas células intestinais; **C:** imagem sobreposta. **NC:** controle negativo. A barra de escala representa 50 μm. Observação em microscópio confocal com aumento de 10x. Fonte: elaborado pela autora.

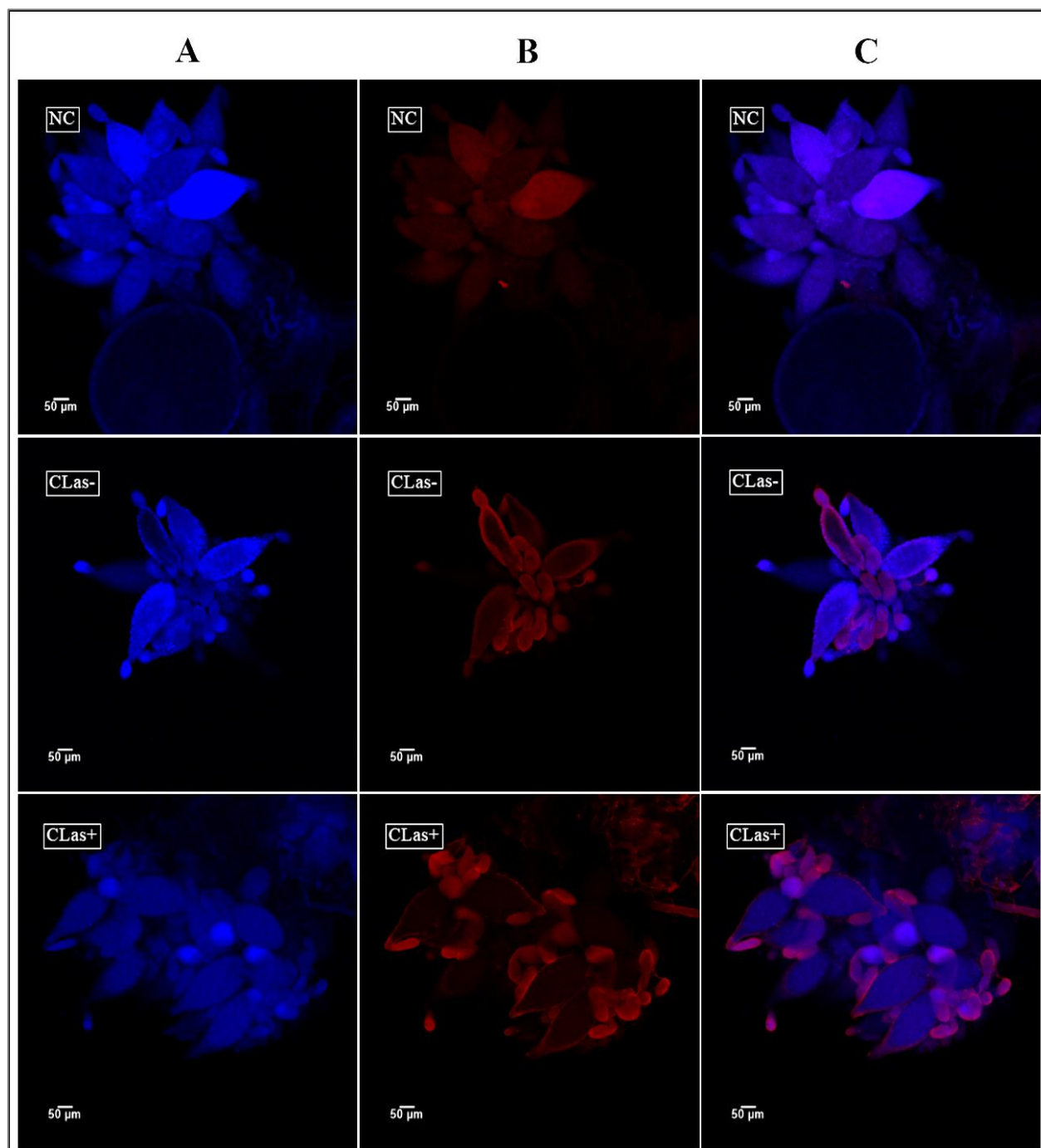


Fig. 46- Imunomarcção para detectar a proteína DcCathL em tecidos de ovário dissecados de *Diaphorina citri* saudável (CLas -) e infectado (CLas +). A: DAPI (azul) corando os ovos e oócitos; **B:** Anticorpo DcCathL + Alexa flúor-568 (vermelho) marcando a proteína alvo nos oócitos e ovos presentes no tecido do ovário; **C:** imagem sobreposta. NC: controle negativo, com autofluorescência intrínseca ao tecido. A discriminação da fluorescência como presença de DcCathL ou autofluorescência tecidual, é dada pela sobreposição das imagens (C), quando há a junção dos filtros DAPI e Fluor568. Assim, a presença da coloração “rosada” na fileira C indica a expressão de DcCathL, enquanto a ausência da coloração rósea confirma o controle negativo, não indicando a interação inespecífica do anticorpo primário anti-DcCathL. A barra de escala representa 50 µm. Observação em microscópio confocal com aumento de 10x. Fonte: elaborado pela autora.

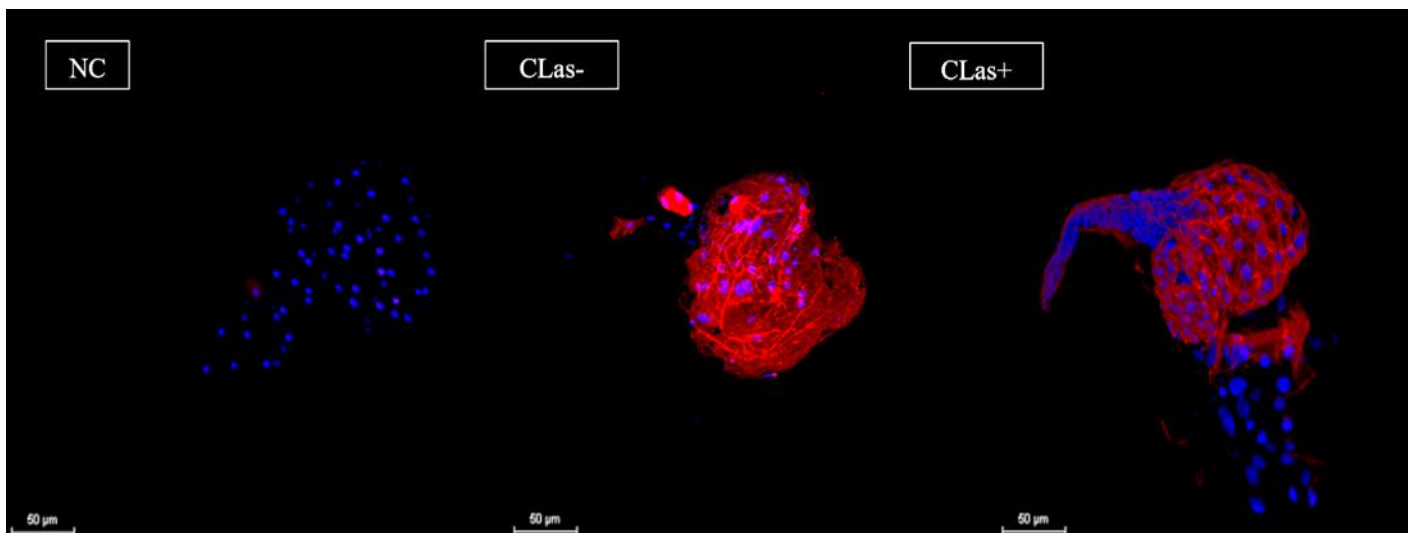


Fig. 47- Imunomarcção para detectar a proteína DcCathL em glândulas salivares dissecadas de *Diaphorina citri* saudável (CLas -) e infectado (CLas +). NC: controle negativo; glândula salivar corada com DAPI (azul), destacando os núcleos celulares da glândula; **CLas-: sobreposição das imagens coradas com DAPI, marcando os núcleos celulares (azul), e marcação da proteína DcCathL com anticorpo DcCathL + Alexa-Flúor-568 (vermelho), na glândula salivar dissecada de um inseto livre de bactéria (CLas-); **CLas+:** sobreposição das imagens coradas com DAPI, marcando os núcleos celulares (azul), e marcação da proteína DcCathL com anticorpo DcCathL + Alexa Flúor-568 (vermelho), na glândula salivar dissecada de um inseto contendo a bactéria (CLas+). A barra de escala representa 50 µm. Observação em microscópio confocal com aumento de 40x. Fonte: elaborado pela autora.**

4.4 Predição *in silico* da localização subcelular das catepsinas DcCathB e DcCathL

As análises *in silico* da DcCathB e DcCathL realizadas no *software online* “Protter”, indicam que ambas as proteínas são secretadas para a porção periférica da célula, como pode ser visto nas imagens abaixo (Figuras 48 e 49), e não apresentam domínio transmembrana.

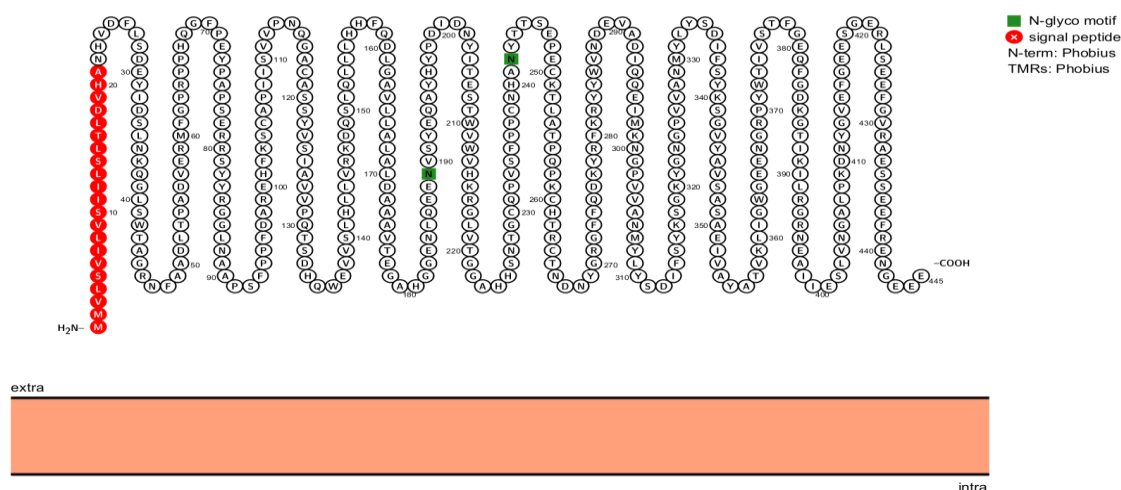


Fig. 48 – Predição *in silico* da localização subcelular da proteína DcCathB (Protter). A predição foi realizada através do software Protter que indica que a proteína é secretada para o meio extracelular. A região em vermelho na representação indica a presença do peptídeo sinal. A região delimitada por um retângulo rosado representa a membrana celular. “Extra” e “Intra” indica a localização extra ou intracelular da proteína, respectivamente. Fonte: Omasits et al., 2014; disponível em: <https://wlab.ethz.ch/protter/start/>

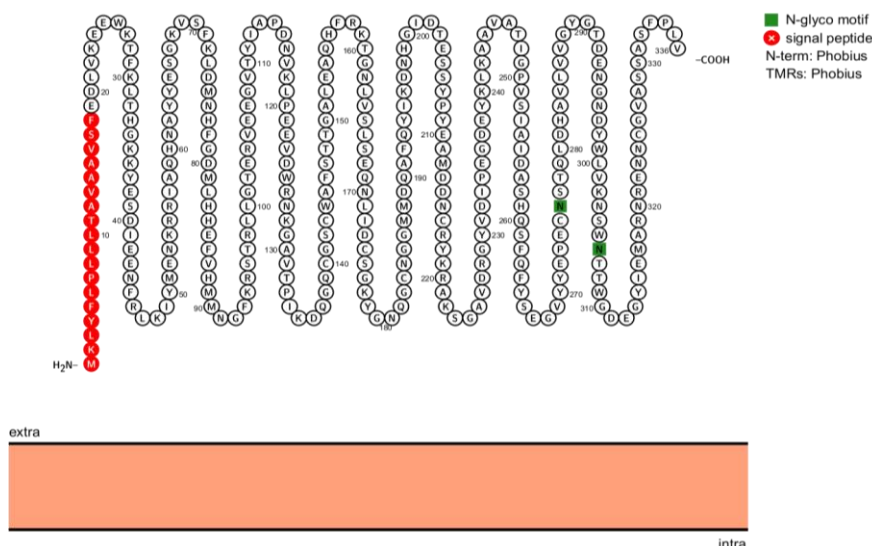


Fig. 49 – Predição *in silico* da localização subcelular da proteína DcCathL (Protter). A predição foi realizada através do software Protter que indica que a proteína é secretada para o meio extracelular. A região em vermelho na representação indica a presença do peptídeo sinal. A região delimitada por um retângulo rosado representa a membrana celular. “Extra” e “Intra” indica a localização extra ou intracelular da proteína, respectivamente. Fonte: Omasits et al., 2014; disponível em: <https://wlab.ethz.ch/protter/start/>

A ferramenta de predição da “multilocalização” subcelular proteica, “DeepLoc 2.0”, apresentou um resultado semelhante quanto a localização de DcCathB e DcCathL (Figuras 50 e 51).

Localization	Cytoplasm	Nucleus	Extracellular	Cell membrane	Mitochondrion	Plastid	Endoplasmic reticulum	Lysosome/Vacuole	Golgi apparatus	Peroxisome
Probability	0.2629	0.0594	0.8228	0.1346	0.0461	0.0062	0.3757	0.4574	0.2647	0.0008

DcCathB
Predicted Signals: Signal peptide

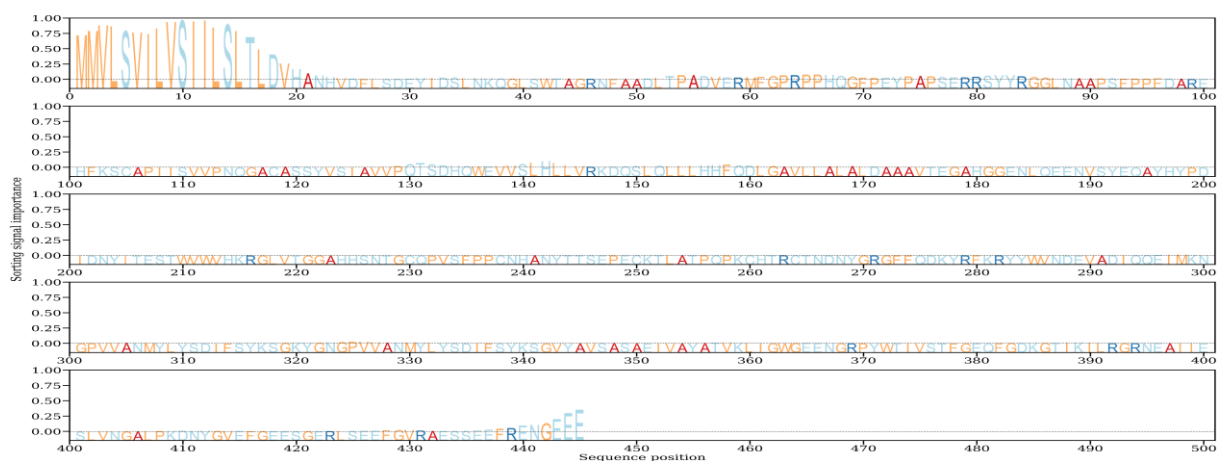


Fig. 50 – Predição *in silico* da localização subcelular da proteína DcCathB (DeepLoc 2.0). A predição foi realizada através do software DeepLoc 2.0, que sugere com base na sequência de aminoácidos que a proteína é secretada para o meio extracelular. Na primeira porção da imagem tem-se uma tabela indicando a probabilidade individual para cada localização na célula em que DcCathL pode ocupar, com destaque em verde para a localização mais provável desta proteína na célula. Na porção inferior da imagem, tem-se a sequência de aminoácidos de DcCathB, e as letras com aumento indicam a região (peptídeo-sinal) responsável por influenciar na determinação da localização da proteína-alvo. Fonte: Thumluri et al., 2022; disponível em: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-2.0/>

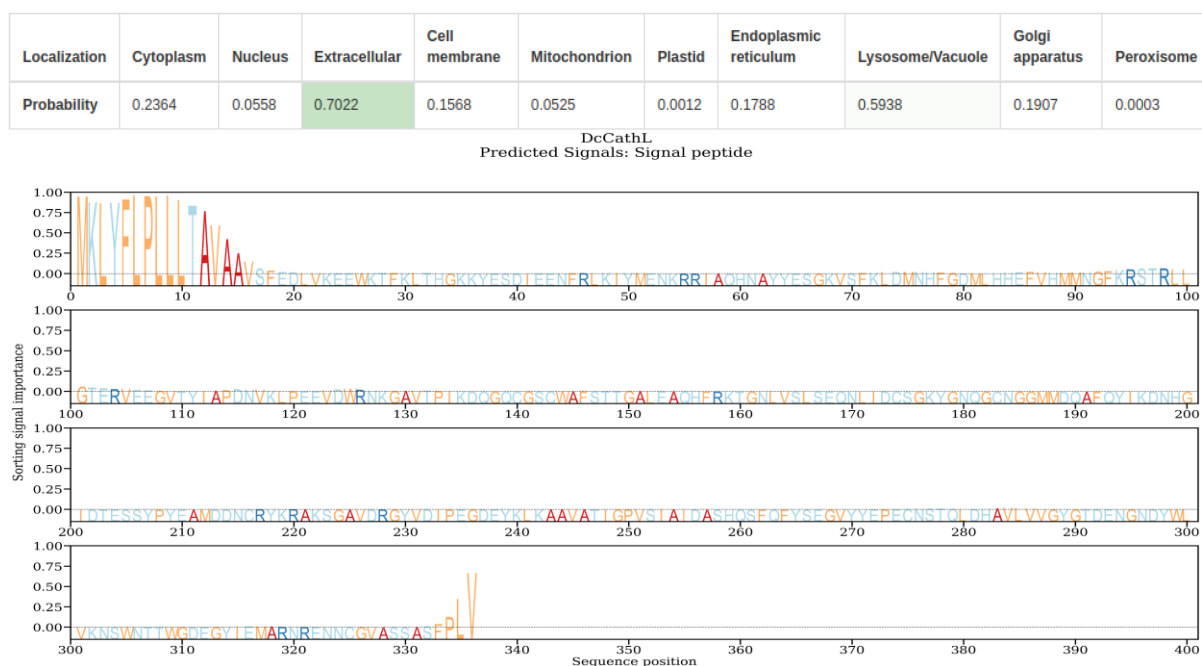


Fig. 51 – Predição *in silico* da localização subcelular da proteína DcCathL (DeepLoc 2.0). A predição foi realizada através do software DeepLoc 2.0, que sugere com base na sequência de aminoácidos que a proteína é secretada para o meio extracelular. Na primeira porção da imagem tem-se uma tabela indicando a probabilidade individual para cada localização na célula em que DcCathL pode ocupar, com destaque em verde para a localização mais provável desta proteína na célula. Na porção inferior da imagem, tem-se a sequência de aminoácidos de DcCathL, e as letras com aumento indicam a região (peptídeo-sinal) responsável por influenciar na determinação da localização da proteína-alvo. Fonte: Thumhuri et al., 2022; disponível em: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-2.0/>

Os resultados do DeepLoc 2.0 apresentaram uma probabilidade de 0,8228 indicativa da localização extracelular de DcCathB, enquanto para DcCathL as probabilidades foram de 0,7022 e 0,5938 para localização na porção extracelular e no lisossomo, respectivamente. Os valores de probabilidade retornados no software, preditivos de alguma localização específica, se baseiam no valor de *threshold* pré-estabelecido na ferramenta (Anexo I).

4.5 Produção recombinante das proteínas CclemCPI-1 e CsinCPI-2 para testes em dieta artificial

As cistatinas de citros (CclemCPI-1 e CsinCPI-2), bem como a GFP, foram expressas com êxito no sistema heterólogo bacteriano (células NiCO21), seguindo as instruções do fabricante. Estas proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade e as bandas de proteínas visualizadas na análise SDS-PAGE (15%) são apresentadas abaixo (Figura 52).

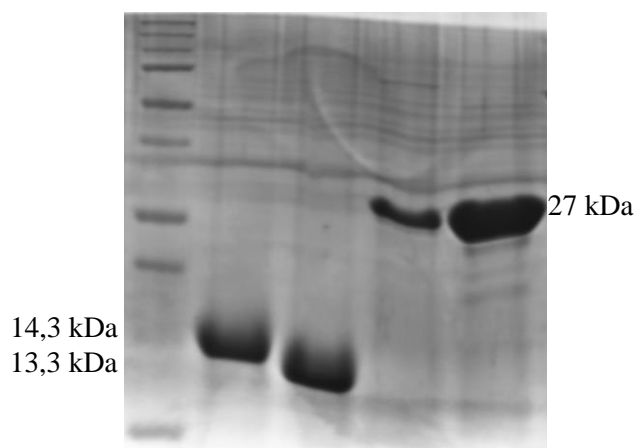


Fig. 52- SDS-PAGE 15% mostrando as proteínas recombinantes purificadas. M: Marcador de peso molecular proteico; **1:** Banda correspondente à proteína CclemCPI-1 com 14,3 kDa; **2:** Banda correspondente à proteína CsinCPI-2 com 13,3 kDa; **3 e 4:** Banda correspondente à proteína GFP com 27 kDa. Fonte: elaborado pela autora.

Na análise de SDS-PAGE (15%) mostrada acima (Figura 52), pôde ser visualizado as bandas correspondentes às proteínas CclemCPI-1 de 14,3 kDa, CsinCPI-2 com 13,3 kDa e GFP com 27 kDa. As proteínas recombinantes obtidas foram utilizadas no teste de eclosão de ovos de *D. citri* em meio artificial, bem como em ensaios de dieta artificial para avaliar os efeitos da proteína recombinante no processo de alimentação do psilídeo *D. citri*.

4.6 Ensaio com ovos de *D. citri* para verificar o padrão de eclosão de ovos na presença ou ausência da cistatina CsinCPI-2

Nas primeiras horas após a colocação dos ovos na superfície do meio de eclosão, sob estereomicroscópio, foi possível observar a ninfa de 1º instar de *D. citri* no interior do ovo (Figura 53).



Fig. 53 – Cultivo para eclosão de ovos de *D. citri* em meio artificial. É possível ver o primeiro ínstar ninfal (seta azul) dentro do ovo (seta vermelha). Fonte: elaborado pela autora.

Em cada réplica foram obtidas ninfas eclodidas dos respectivos ovos já nas primeiras 24h para o grupo controle (Figura 54). É possível observar a ninfa ao lado da casca do ovo logo após sua eclosão (Figura 54A), a ninfa produzindo *honeydew* (Figura 54B), e a ninfa se alimentando no meio artificial (Figura 53C), onde foi também observada a projeção total do estilete bucal da ninfa (Figura 55), indicando que a ninfa estava se alimentando adequadamente neste meio de cultura artificial, como esperado (Santos-Ortega e Killiny, 2020).

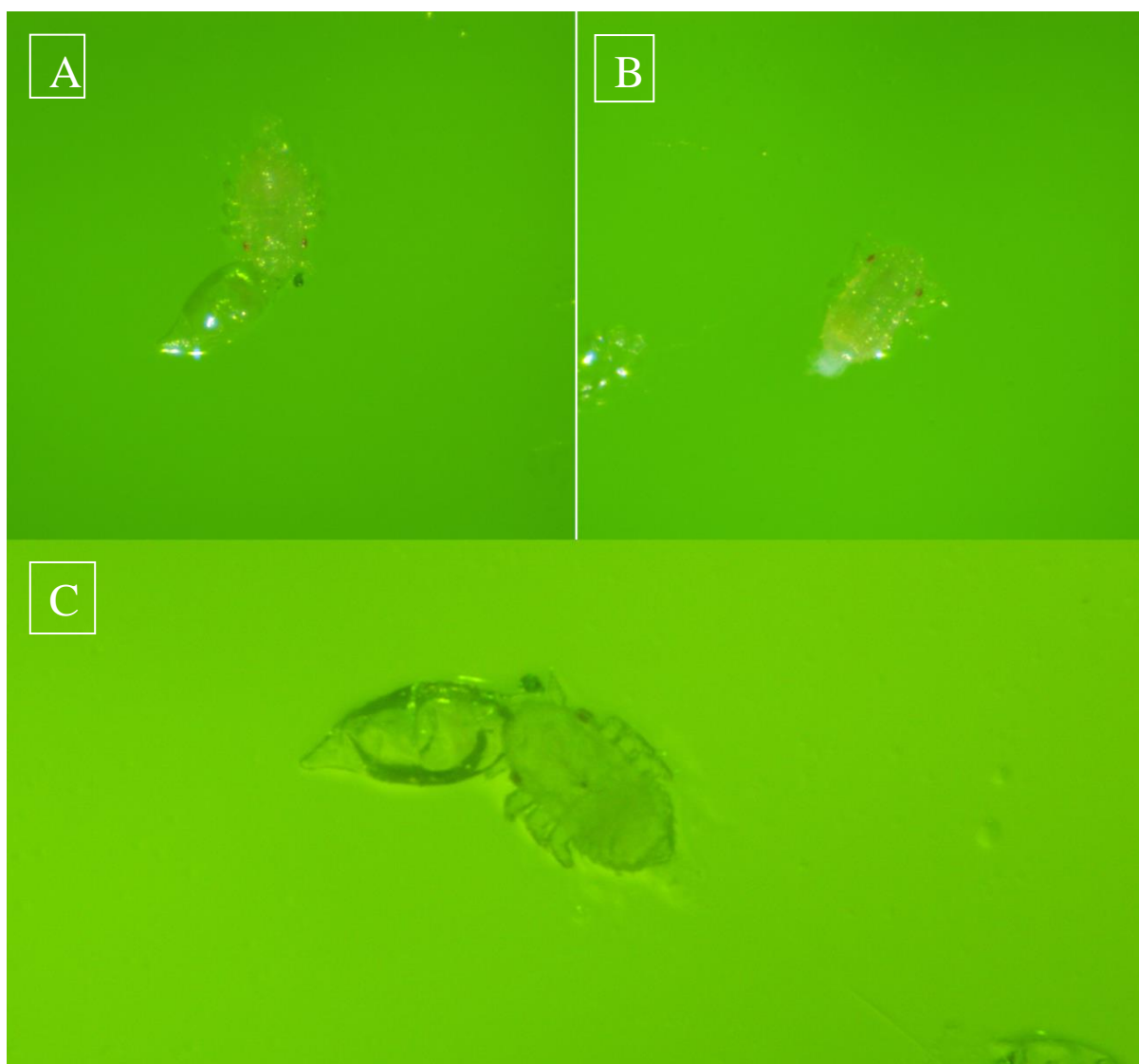


Fig. 54– Cultivo artificial para ensaio de eclosão de ovos de *Diaphorina citri*. A: Ninfa de primeiro ínstar recém eclodida próxima ao envoltório do ovo (seta amarela); **B:** ninfa no primeiro ínstar recém-eclodida produzindo *honeydew* (seta vermelha); **C:** é possível ver o estilete da ninfa protuso (seta azul) indicando sua alimentação neste meio artificial. Fonte: elaborado pela autora.

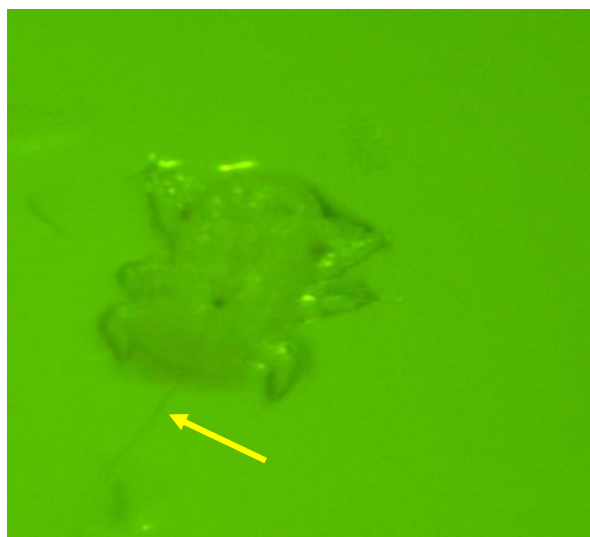


Fig. 55 – Ninfa de *Diaphorina citri* se alimentando em meio artificial. O estilete da ninfa está completamente projetado para for a (seta amarela) indicando a alimentação do inseto. Fonte: elaborado pela autora.

Um total de 8 e 5 ninfas eclodiram em cada réplica de PBS passadas 72h, isto corresponde a uma taxa de eclosão média de 43,3% no grupo de controle, contrastando com 4 e 2 ovos eclodidos no grupo contendo a proteína CsinCPI-2, o que representa uma taxa de eclosão média de 20% na presença da proteína recombinante. Apesar da eclosão de ovos na presença ou ausência da proteína CsinCPI-2 não ter apresentado uma diferença estatisticamente significativa com base no teste de Kruskal-Wallis ($P=0,163$) (Figura 56), houve uma taxa de eclosão de ovos 53,8% menor na presença da proteína em relação ao controle.

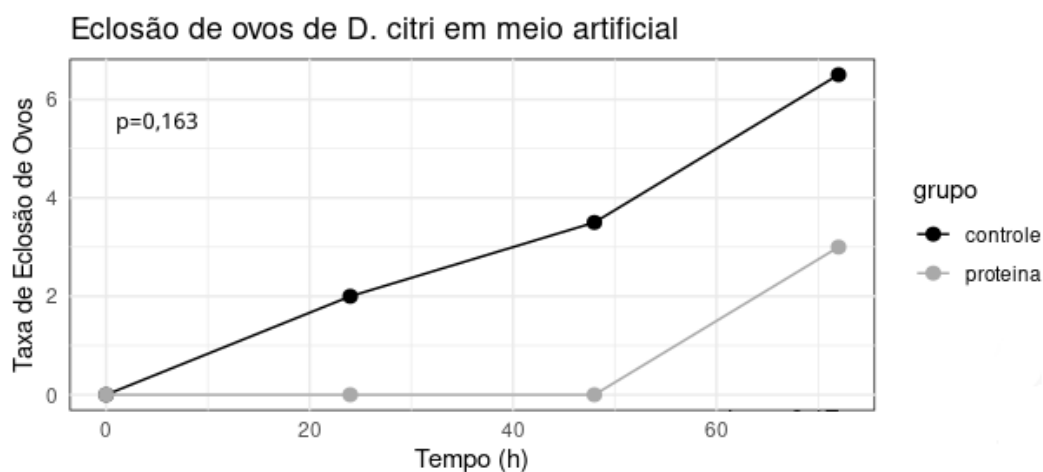


Fig. 56 – Gráfico representativo da taxa de eclosão de ovos de *Diaphorina citri* em meio artificial na presença e ausência da proteína CsinCPI-2 em função do tempo. No gráfico temos a taxa média de eclosão de ovos no grupo controle e no grupo contendo a proteína CsinCPI-2. É visível uma redução da taxa de eclosão dos ovos presentes no grupo contendo a proteína. Porém, com base no teste de Kruskal-Wallis a 95% de significância, o valor de p foi maior que 0,05 ($p=0,1633$), isto é, não há diferença estatisticamente significativa. A análise estatística foi realizada com o software RStudio, bem como gráfico (v. 2023.6.2.561). Fonte: elaborado pela autora.

4.7 Ensaios de dieta artificial para ninfas e adultos de *D. citri*

Os ensaios de alimentação usando Kimwipes® e por sachês de parafilme contendo rGFP (ou 0,1x PBS para o controle do experimento) foram testados com ninfas e adultos saudáveis de *D. citri* (CLas -), respectivamente. Foi observada uma cor verde fluorescente no trato digestivo das ninfas e dos adultos que se alimentaram da dieta contendo a proteína GFP recombinante e ausência de tal fluorescência nos insetos que se alimentaram no grupo controle (PBS), indicando a absorção bem sucedida da GFP pelos insetos no processo de alimentação por Kimwipes® e por sachês de parafilme (Figura 57A e B).

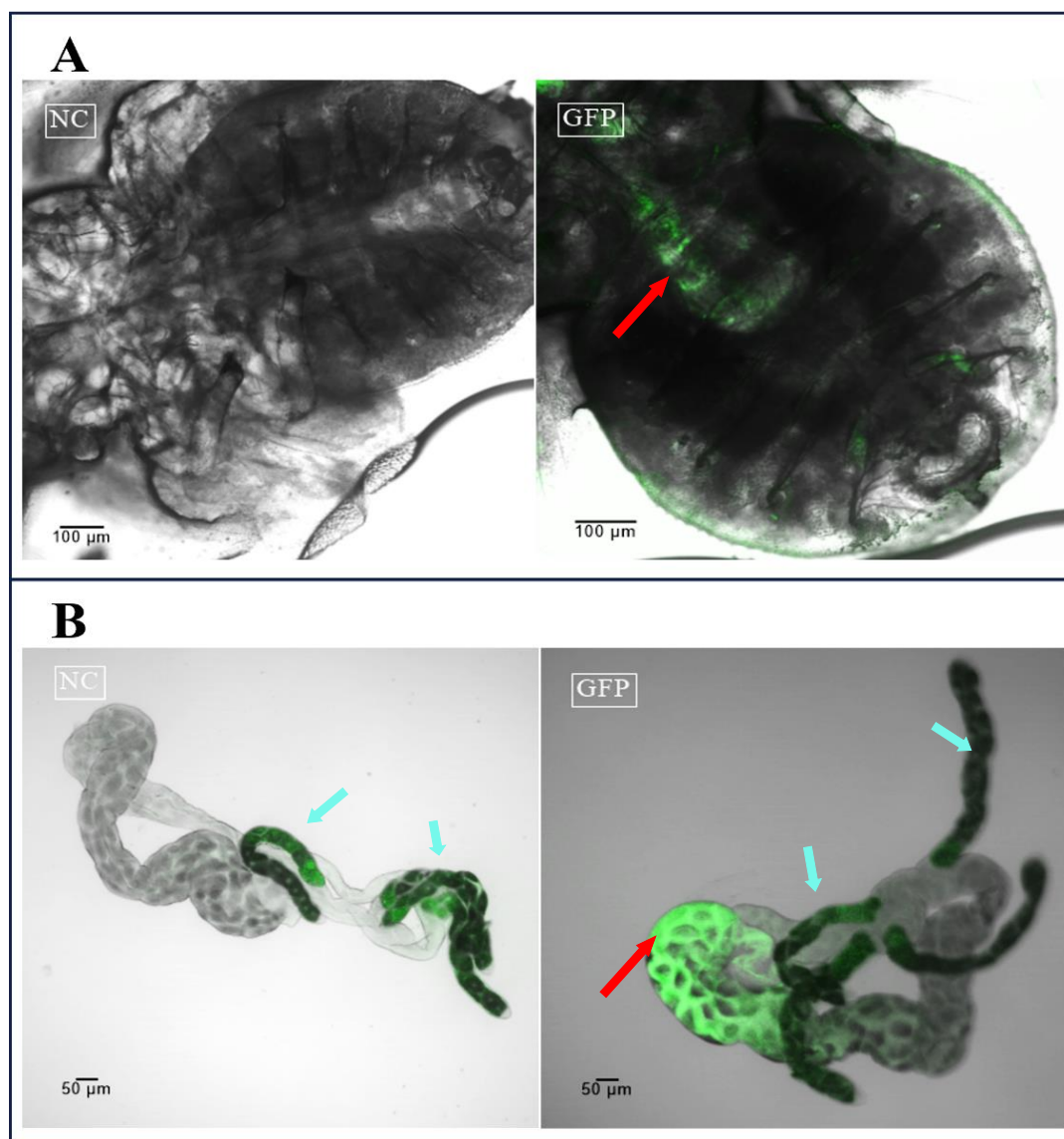


Fig. 57- Captura de rGFP de dieta artificial por *D. citri*. **A:** Detecção de rGFP em ninfas do 5º ínstar; **B:** Detecção de rGFP no intestino médio de adultos de *D. citri* após 48h de alimentação **NC:** controle negativo. A barra de escala representa 100 µm, para a microscopia das ninfas (A), 50 µm para o intestino dos insetos adultos (B). Os túbulos de Malpighi apresentam coloração verde (setas azuis) devido a autofluorescência comum neste tecido (A e B). Porém, a indicação de que houve a absorção de GFP adequadamente, se dá pela presença da fluorescência verde na porção do intestino médio (seta vermelha) (B). Fonte: elaborado pela autora.

Ambos os bioensaios com dieta artificial foram utilizados para avaliar o efeito da proteína recombinante CsinCPI-2 contra ninfas de *D. citri* livres de CLAs em comparação à insetos infectados por CLAs. Durante 72h de observação, notou-se uma redução significativa na probabilidade de sobrevivência para a população de psíldeos CLAs- na presença da proteína CsinCPI-2 ($df = 1$; $P < 0,0001$) (Figura 58A), contrastando com diferenças não estatisticamente significativas encontradas para a população infetada por CLAs ($df = 1$; $P = 0,25$) (Figura 58B). O efeito da proteína recombinante CclemCPI-1 foi incluído em uma das avaliações que comparou o efeito das duas cistatinas CsinCPI-2 e CclemCPI-1 em populações de *D. citri* saudáveis (CLAs-) na fase de ninfa e adultos. Não houve diferença significativa na taxa de sobrevivência dos insetos adultos na presença das cistatinas CclemCPI-1 ou CsinCPI-2 em comparação ao grupo controle ($df = 1$; $P = 0,79$) (Figura 59A). Por outro lado, para o estágio ninfal, novamente, observou-se uma interferência significativa das cistatinas na taxa de sobrevivência dos insetos em comparação ao grupo controle ($df = 1$; $P = 0,013$) (Figura 59B). A taxa de sobrevivência foi determinada pelo método de regressão de Cox (*Proportional Hazards Model*).

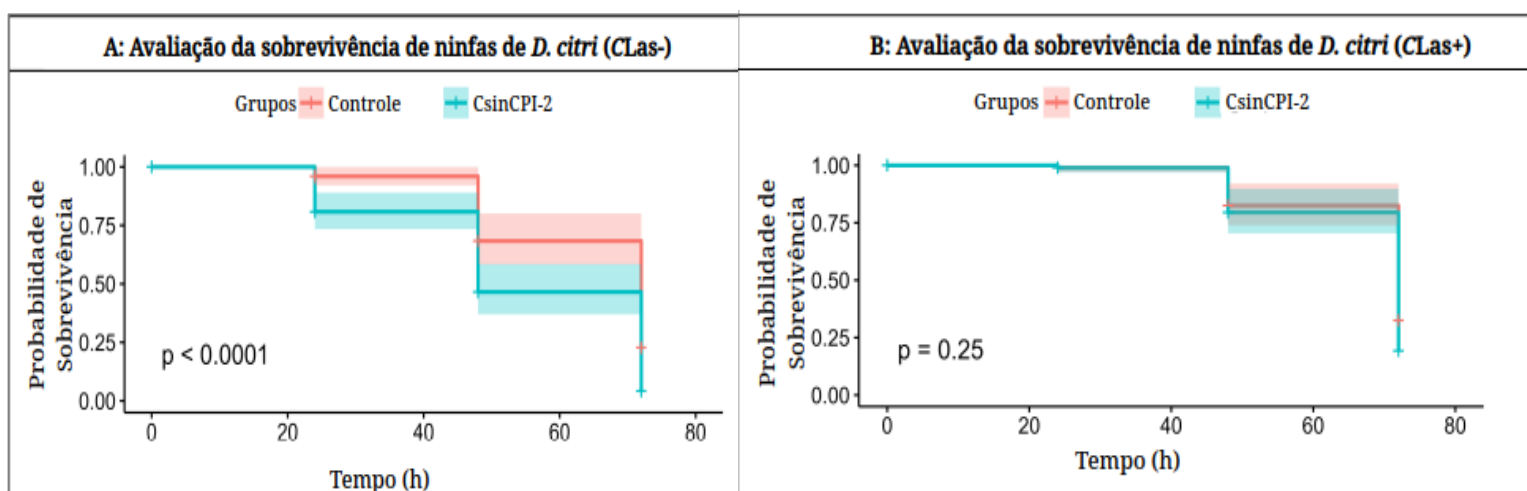


Fig. 58- Regressão de riscos proporcionais de Cox mostrando a probabilidade de sobrevivência em 72h de avaliação para ninfas de *D. citri* em ensaio de alimentação em Kimwipes®. **A:** probabilidade de sobrevivência de ninfas saudáveis na presença ou ausência da proteína recombinante CsinCPI-2 em 72h de experimento; **B:** probabilidade de sobrevivência de ninfas infectadas na presença ou ausência da proteína recombinante CsinCPI-2 em 72h de experimento. A análise estatística foi efetuada utilizando o software RStudio (v. 2023.6.2.561). Fonte: elaborado pela autora.

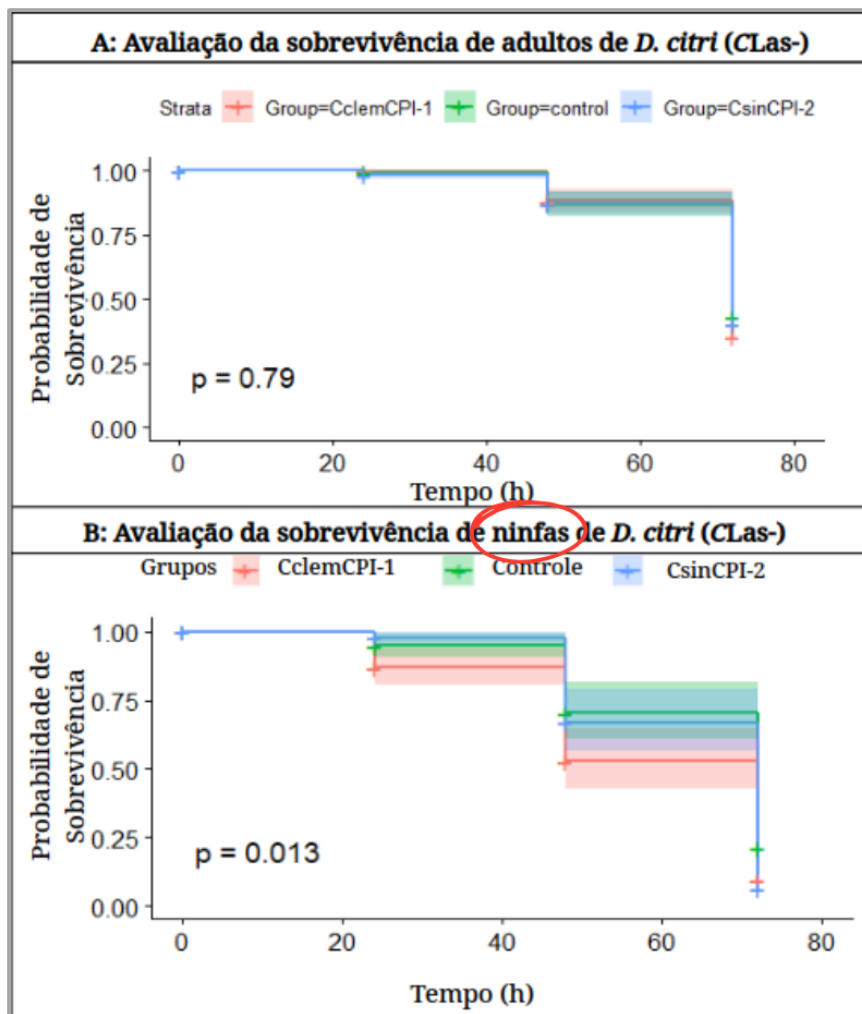


Fig. 59 – Regressão de riscos proporcionais de Cox mostrando a probabilidade de sobrevivência em 72h de avaliação para adultos e ninfas saudáveis de *D. citri*. A: probabilidade de sobrevivência de adultos saudáveis na presença ou ausência das proteínas recombinantes CclemCPI-1 ou CsinCPI-2 em 72h de experimento; **B:** probabilidade de sobrevivência de ninfas saudáveis na presença ou ausência das proteínas recombinantes CclemCPI-1 e CsinCPI-2 em 72h de experimento. A análise estatística foi efetuada utilizando o software RStudio (v. 2023.6.2.561). Fonte: elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

As enzimas DcCathB e DcCathL estão relacionadas às importantes fases do desenvolvimento dos insetos, como o *turnover* de proteínas, a mobilização e a degradação de proteínas vitelínicas, a embriogênese (Medina et al., 1988; Izumi et al., 1994; Cho et al., 1999; Zhao et al., 2002; Ibanez et al., 2023), ecdise/metamorfose (Takahashi et al., 1993; Shiba et al., 2001; Lee et al., 2009), morte celular programada (Yang et al., 2020), digestão (Ferrara et al., 2015; Ferrara et al., 2020) e defesa imunológica (Yu et al., 2019). Portanto, como previamente observado por nosso time de pesquisa, o *knockdown* de *DcCathB* e *DcCathL* em *D. citri*, via CTV-RNAi, resultou em uma redução no desenvolvimento de oócitos e na maturação ovariana comprometida, possivelmente, relacionada à regulação negativa (*downregulation*) do gene *Vitelogenina* (*Vg*) (Ibanez et al., 2023). A interferência significativa no desenvolvimento de *D. citri* alcançada com o silenciamento gênico das catepsinas DcCathB e DcCathL (Ibanez et al., 2023), evidencia o potencial dessas moléculas para limitar a propagação do vetor *D. citri*. Assim, o foco em estratégias que inibem a atividade da catepsina mostra uma abordagem interessante para manejo do HLB.

As cistatinas são proteínas de defesa e atuam como inibidores de peptidases em vários organismos, inclusive nos insetos (Selitrennikoff, 2001). A atividade dos inibidores deve-se à sua capacidade de formar complexos estáveis com as peptidases alvo, bloqueando o acesso ao sítio ativo da enzima (Haq et al., 2004). A utilização de cistatinas no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a insetos e agentes patogênicos é uma estratégia que tem sido amplamente estudada, na qual os respectivos genes que codificam inibidores de peptidases são inseridos no genoma da planta, possibilitando assim a obtenção de plantas com características melhoradas (Jouanin et al., 2000; Lawrence e Koundal, 2002; Haq et al., 2004; Outchkourov et al., 2004; Ribeiro et al., 2008; Chen et al., 2014).

Além disso, como descrito anteriormente, quando os insetos são submetidos a uma dieta artificial que contém inibidores específicos para a principal classe de proteases nos seus intestinos, o seu crescimento e desenvolvimento são retardados e têm-se um aumento significativo nas taxas de mortalidade (McManus e Burgess, 1995). Estudos prévios realizados em nosso grupo, demonstraram que as proteínas cistatinas de citros são inibidores potentes contra as enzimas catepsinas de *D. citri*, onde a DcCathB foi inibida principalmente pela cistatina recombinante CclemCPI-1 (Schneider et al., 2020), enquanto a DcCathL foi fortemente inibida pela proteína inibidora CsinCPI-2 (Ferrara et al., 2020). Isto reforça a nossa

hipótese da importância da interação DcCathB e DcCathL/Cistatinas como um alvo potencial para interferir na relação vetor/bactéria do HLB.

Para descrever redes de interação proteína-proteína, o método mais frequentemente utilizado é o Y2H (Brückner et al., 2009), uma abordagem genética *in vivo* bem estabelecida, capaz de detectar interações proteicas em células de levedura vivas (Fields e Song, 1989). Em princípio, uma proteína chamada de isca (*bait*) é expressa em fusão com o domínio de ligação (BD; *Binding Domain*) ao DNA da Gal4 (DNA-BD) e a proteína presa (*prey*) é expressa como uma fusão com o domínio de ativação da Gal4 (AD; *Activation Domain*) (Fields e Song, 1989; Chien et al, 1991); quando as proteínas de fusão isca e presa interagem, o DNA-BD e o AD são aproximados para ativar a transcrição de quatro genes repórteres independentes (AUR1-C, ADE2, HIS3 e MEL1) (Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System User's Manual).

As interações entre proteínas são essenciais para o crescimento e sobrevivência das células e, conseqüentemente, para a sobrevivência dos organismos, e servem como alvos estratégicos para desenvolver inibidores de processos biológicos, como as interações hospedeiro-patógeno (Wong et al., 2017). Os resultados obtidos demonstraram uma possível interação entre DcCathL e as cistatinas CclemCPI-1 e CsinCPI-2 devido à cor azulada nas colônias transformantes. No entanto, a cor azulada também foi encontrada na cotransformação do vetor vazio pGADT7 com a construção de DNA pGBKT7-CathL. A ativação de repórteres responsivos à Gal4 na ausência da “presa” caracteriza um resultado falso positivo; o que significa que, neste formato de construção, a “isca” (DcCathL) não precisou da “presa” (CclemCPI-1 ou CsinCPI-2) para ativar os repórteres (*Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System User's Manual*).

Embora os nossos estudos de Y2H tenham apresentado um resultado falso positivo, o conhecimento adquirido nos permitirá ajustar facilmente as construções gênicas para alcançar o resultado esperado. Possivelmente, os nossos próximos passos envolverão a clonagem de DcCathL no vetor pGADT7, bem como a clonagem das cistatinas (CclemCPI-1 e CsinCPI-2) no vetor pGBKT7, para identificar qual seria a construção molecular mais adequada para confirmar essa interação proteica. Além disso, partindo do princípio de que a DcCathL é uma enzima, é interessante produzir construções que contenham a sequência do pro peptídeo (Guo et al., 2020), além da enzima madura. O nosso próximo objetivo incluirá a clonagem do gene DcCathB em vectores Y2H, para avaliar também a interação desta enzima com as cistatinas. Estas soluções propostas visam contornar as possíveis deficiências do sistema Y2H. Por exemplo, para estudar proteínas que normalmente não se localizam no núcleo, pode ser

necessário gerar formas mutantes da proteína que possam ser transportadas através da membrana nuclear (*Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System User's Manual*).

Fundamentalmente, as enzimas do tipo catepsinas têm sido amplamente estudadas e são atualmente um alvo potencial no manejo de *D. citri* (Ibanez et al., 2023). Devido à conhecida importância da enzima DcCathS para o desenvolvimento de *D. citri*, concentramos a nossa investigação nestas moléculas como alvo. *A priori*, partimos do pressuposto de que a presença de bactérias CLas em *D. citri* influencia a expressão dos genes DcCathB e DcCathL, e tal hipótese foi corroborada através de análises de qPCR e FISH. Essas análises mostraram que *DcCathB* é regulada negativamente e *DcCathL* é regulada positivamente na presença da bactéria CLas. Embora esses achados usando análises de qPCR já tenham sido descritos em Kruse et al. (2017) e Yu et al. (2019), respectivamente, esta é a primeira vez que um padrão espaço-temporal da expressão de *DcCathB* e *DcCathL* foi proposto para psilídeos de *D. citri*, o que corrobora a análise de PCR em tempo real. A interferência na expressão gênica de *DcCathB* e *DcCathL* em *D. citri* infectados pela bactéria CLas, sugere de forma interessante que tais enzimas devem estar envolvidas no sistema de resposta imunológica de *D. citri*, como descrito anteriormente para DcCathL em Yu et al. (2019), apesar de outras funcionalidades atreladas à esta proteína.

Vale destacar, que os insetos são deficientes de um sistema imunológico adaptativo, contando exclusivamente com o sistema imune inato para regular essas interações hospedeiro-patógeno (Lemaitre e Hoffmann, 2007). Curiosamente, o aumento da expressão de *DcCathL* se dá na fase ninfal do inseto e, portanto, deve estar relacionada a aquisição de CLas, já que é nessa mesma fase onde têm-se a maior aquisição da bactéria (Hall et al., 2012). Além disso, apesar de não se saber ao certo como, durante a infecção, a bactéria CLas ultrapassa as barreiras do intestino ou vence a resposta imune do inseto, CLas deve alcançar as glândulas salivares antes de ser transmitida (Yu et al., 2019).

De igual modo, em nossos estudos observamos um aumento da *DcCathL* na presença de CLas, corroborando o que já foi descrito por Yu e colaboradores (2019). Não obstante, foi também observada uma considerável expressão de DcCathL nas glândulas salivares de *D. citri* em nossos ensaios de imunolocalização. De acordo, o aumento na expressão de *DcCathL*, indica uma regulação negativa dos genes da via *Toll*, ou seja, sugerindo uma deficiência na reposta de defesa do inseto podendo estar atrelada a uma manipulação do patógeno, a fim de garantir sucesso em sua infecção no hospedeiro. Em conjunto, esses fatos nos permitem inferir, que DcCathL deve estar associada ao sucesso na transmissão de CLas pelo inseto vetor do HLB

(Yu et al., 2019). Já para a DcCathB, os estudos precisam ser melhores explorados, mas, a princípio, é curioso pensar numa regulação imposta pela bactéria oposta ao observado para DcCathL, onde tal patógeno é capaz de suprimir (*downregulate*) a expressão desse gene nos insetos.

Além disso, a imunolocalização da proteína DcCathL foi investigada no nosso presente trabalho em três tecidos diferentes do vetor do HLB, tais como o intestino médio, o ovário e a glândula salivar. A principal observação foi a expressão aumentada da proteína no tecido do intestino médio em comparação com os outros tecidos. Uma análise da expressão do gene *DcCathL* em *D. citri* com resultado similar foi descrita anteriormente por nosso grupo, prevendo assim um papel importante como uma enzima digestiva (Ferrara et al., 2020), como também agora demonstrado, um padrão também encontrado em outros hemípteros (Pimentel et al., 2020). No entanto, como sugerido na literatura (Yu et al., 2019; Ibanez et al., 2023), podemos assumir também pela presença de DcCathL no ovário e nas glândulas salivares a participação significativa em outras funções, como o desenvolvimento embrionário e participação no sistema imunológico, respetivamente. Foi relatada uma elevada expressão de uma *Catepsina B* -like na saliva e glândulas salivares do afídeo *Myzus persicae*, associada à elicitación da resposta de defesa do hospedeiro (Guo et al., 2020).

Curiosamente, corroborando a análise de expressão gênica, a imunolocalização proteica de DcCathL mostrou o mesmo padrão na presença da bactéria CLas, onde detectamos uma maior fluorescência nos tecidos infectados de *D. citri* em comparação com os tecidos provenientes de insetos saudáveis, indicando um aumento da expressão de DcCathL no intestino, nos ovários de psilídeos infectados pela bactéria CLas. O aumento da expressão da proteína nos insetos na presença da bactéria, bem como a expressão proteica observada nas glândulas salivares, reforça o envolvimento de DcCathL na resposta do sistema imunológico de *D. citri* (Yu et al., 2019; Ibanez et al., 2023).

Além disso, foi observada a localização subcelular da enzima DcCathL mais concentrada nas zonas periférica das membranas celulares nos tecidos digestivo e ovariano de *D. citri*. Ainda, o uso de ferramentas computacionais de predição, corroboraram a observação resultante da imunolocalização de DcCathL, atestando a localização extracelular da enzima. A predição da localização subcelular de proteínas é extremamente relevante para estudos proteômicos e melhor compreensão da funcionalidade proteica (Thumuluri et al., 2022). Protter, oferece suporte à análise de sequências proteicas e à geração de hipóteses, por meio da visualização de características de sequências anotadas de referência (UniProt, Phobius, etc.),

também baseados na topologia de proteínas (PeptideAtlas) (Osmaisits et al., 2014). Por sua vez, DeepLoc 2.0, baseada em *deep learning*, foi curada através de conjuntos de dados (UniProt: SwissProt e TrEMBL) extensos de proteínas eucarióticas com multi-localizações (Thumuluri et al., 2022).

O uso de duas ferramentas de predição diferentes, somadas ao ensaio de imunolocalização proteica, sugerem fortemente para a localização subcelular de DcCathL na porção extracelular dos tecidos de *D. citri*, além da provável localização desta proteína também nos lisossomos, vista através do DeepLoc 2.0. Corroborando, em Yu e colaboradores (2019), foi sugerido de igual forma a possível secreção de DcCathL devido a presença de um peptídeo sinal em sua sequência de aminoácidos. Da mesma forma, uma predição *in silico* também foi realizada para DcCathB, que igualmente sugere a localização extracelular desta catepsina. Ainda, outras análises *in silico* foram realizadas e não demonstraram a presença de domínio transmembrana (dados não mostrados), o que sugere que a proteína fica próxima as regiões membranares, porém, livre, ou mesmo no espaço extracelular. Apesar das catepsinas estarem majoritariamente associadas à atividade lisossomal, em humanos a descoberta de que a catepsina é secretada e permanece ativa fora do lisossomo provocou uma mudança de paradigma (Vidaki et al., 2019; Yadati et al., 2020). De acordo com Matsumoto e colaboradores (1997), as catepsinas de insetos são homólogas às catepsinas humanas, sendo que a maioria dessas enzimas, ocupam os lisossomos ou espaços extracelulares. Ainda, tem sido demonstrado que a catepsina é comumente *upregulated* extracelularmente em condições patológicas (Yadati et al., 2020), extrapolando, corresponde ao que foi encontrado em nossas análises para *D. citri* considerando a DcCathL.

Visando melhorar a nossa compreensão acerca das DcCaths-alvo (DcCathB e DcCathL) *in vivo*, concomitantemente com a interação entre a bactéria e o inseto vetor, as cistatinas de citros foram implementadas em testes de dieta artificial, ou de eclosão de ovos em ambiente artificial, para confirmar os efeitos nocivos da inibição das DcCaths para *D. citri*. A proteína CclemCPI-1 foi incluída nos testes de dieta artificial apenas em um dos testes para o verificar o efeito das cistatinas (CsinCPI-2 e CclemCPI-1) sobre de ninfas e adultos. Em ambos os casos, as populações de *D. citri* observadas eram livres de bactéria. Com relação à cistatina CsinCPI-2, foram efetuadas quatro réplicas técnicas para testes contendo populações de *D. citri* infectadas e livres de CLas. Foi possível observar, em primeiro lugar, uma diferença associada aos estágios de desenvolvimento dos psílídeos, onde ambas as cistatinas, CclemCPI-1 e CsinCPI-2, apresentaram uma interferência significativa na taxa de sobrevivência de ninfas

($P=0,013$), contrastando com uma redução não significativa na taxa de sobrevivência de adultos de *D. citri* ($P=0,79$), ambos livres de CLas. De acordo, tem sido demonstrado um aumento na expressão de catepsinas em *D. citri* por meio de qPCR no estágio ninfal em comparação com o adulto (Yu et al., 2019), e possivelmente, como as DcCaths são menos expressas em adultos, a inibição mediada pelas cistatinas não é capaz de alterar suficientemente a taxa de sobrevivência neste estágio. Além disso, o estágio ninfal é a fase em que o psilídeo consome mais tempo se alimentando, e o aumento deste tempo despendido na alimentação (Ammar et al., 2020), claramente, favorece a absorção da cistatina pelas ninfas em comparação com os adultos.

Especificamente, a CsinCPI-2, principal responsável pela inibição da DcCathL, mostrou um aumento interessante da mortalidade de *D. citri* em populações saudáveis ($P<0,0001$) mas não em populações infectadas ($P=0,25$), ou seja, na população infectada por CLas a atuação da proteína CsinCPI-2 na sobrevivência dos psilídeos é equivalente ao grupo de controle, estatisticamente. O aumento na expressão de DcCathL encontrada na população infectada por CLas, possivelmente, supera a inibição competitiva mediada por CsinCPI-2. Por outro lado, na ausência de CLas, uma expressão mais baixa de DcCathL maximiza os efeitos da inibição mediada pela cistatina CsinCPI-2, resultando no aumento da mortalidade neste grupo. Estes resultados suportam a hipótese de que a DcCathL é importante na resposta de defesa imunitária em *D. citri*, e as cistatinas de citros podem ser uma ferramenta relevante para o manejo do vetor do HLB. Possivelmente, o nosso próximo passo envolverá mais investigações com CclemCPI-1 em ensaios de dieta artificial com psilídeos saudáveis e infectados, bem como a imunolocalização de DcCathB para uma compreensão mais robusta acerca dos nossos alvos moleculares propostos para o controle de *D. citri*.

A proteína GFP foi utilizada com êxito como proteína modelo para testar a capacidade dos insetos em adquirir as proteínas recombinantes através de ensaios de alimentação artificial (Figura 56), o que valida os ensaios aqui propostos como eficientes para entregar as cistatinas, através do comportamento alimentar de *D. citri*. Além disso, visto que os insetos de fato adquirem a proteína recombinante nesses sistemas de alimentação, nos é assegurado que estes sistemas são úteis para a validação de alvos, já que seus efeitos podem ser testados efetivamente.

Ainda, foram realizados estudos preliminares com ovos de *D. citri* onde foi testado o sucesso da eclosão de ovos em meio artificial (Santos-Ortega e Killiny, 2020) contendo ou não a cistatina CsinCPI-2, durante 72h de avaliação. Foi demonstrada uma redução significativa da eclosão de ovos na presença da proteína CsinCPI-2 (53,8%) em comparação com o grupo

controle (contendo apenas PBS). Embora tenha sido encontrada uma redução na eclosão de ovos aparentemente expressiva na presença de CsinCPI-2, esta diferença não foi estatisticamente significativa com base no teste de Kruskal-Wallis ($P=0,1633$). No entanto, devido a dificuldades associadas a coleta de ovos que é bastante laboriosa, os ovos são pequenos (em média 0,3 mm) e facilmente podem ser danificados na coleta, além da disponibilidade desse material, o N amostral se mostra reduzido e muito aquém do ideal, o que certamente, deve estar interferindo nesses resultados.

Em concordância, tem sido relatada a importante relação de Catepsinas L -like a eclosão de ovos do nematoide *Bursaphelenchus xylophilus* (Xue et al., 2019) e em vitelogênese em *D. citri* (Ibanez et al., 2023). O fato de a DcCathL estar, supostamente, na porção extracelular ou, no mínimo, nas regiões periférico-membranares do ovo, deve ter favorecido a interação entre tal catepsina presente no ovo e a cistatina CsinCPI-2 presente no meio. Essa interação entre CsinCPI-2 e DcCathL, resultando na inibição desta crucial enzima com atividade embriogênica, deve ter culminado nos resultados observados, de baixa eclosão mediada pela proteína inibidora.

Ainda carente de informações robustas, há quem afirme que existe a transmissão vertical, ou transovariana, de CLas para *D. citri* (Pelz-Stelinski, et al., 2010). Ainda que este seja um assunto ainda em debate, e um tanto inconclusivo, uma vez provada a passagem da bactéria verticalmente para os ovos do psíldeo, reforçaria ainda mais a efetividade da implementação da cistatina para o controle do HLB, visto que tal proteína inibidora parece capaz de interferir na eclosão de ovos. Verificar que as cistatinas são capazes de interferir nessa fase do desenvolvimento é bastante animadora, já que tem sido relatada que as fêmeas de *D. citri* depositam em média 350 ovos ao longo do seu ciclo de vida, tem sido relatada uma variação de oviposição que varia entre 180 até 520 ovos dependendo do indivíduo (Pande, 1971). Considerando este fato, o uso das cistatinas mediando a inibição da eclosão dos ovos, pode conferir um controle populacional desta espécie de inseto rapidamente, em um curto prazo, tornando a implementação desta estratégia muito atrativa. Embora este resultado seja muito interessante, indicando um papel de DcCathL no desenvolvimento embrionário de *D. citri*, este foi um teste preliminar bastante promissor, mas que irá requerer investigações mais aprofundadas.

É preciso considerar, no entanto, que o uso de inibidores de peptidases para o controle de pragas, por vezes, gera preocupação, requerendo cuidados para implementação do uso dessas moléculas naturais como estratégia de combate, tal qual como qualquer outra. Dentre as

preocupações para efetivar medidas de manejo em campo, a principal se refere a possíveis efeitos colaterais contra organismos benéficos, como os polinizadores, principalmente. Como bem se sabe, os polinizadores são essenciais para a biodiversidade, e sua contribuição com a produtividade agrícola é imensurável (Gurung e Chettri, 2021). Dentre os polinizadores, as abelhas estão entre os destaques, desempenhando papel fundamental na polinização das principais espécies agrícolas atuais (Klein et al., 2007). Entretanto, a intensificação agrícola e as práticas de monocultura, além de outras questões, têm provocado um declínio global dos polinizadores (Biesmeijer et al., 2006), o que tem ameaçado, seriamente, a segurança alimentar local e global (Van der e Vaage, 2016). Em *Citrus spp.*, apesar dos mecanismos naturalmente bem-estabelecidos de autopolinização e fertilização cruzada, a polinização mediada pela abelha *Apis mellifera* é associada a produção de frutos maiores e de maior qualidade, com sucos menos ácidos, em comparação aos frutos resultantes da autopolinização (Malerbo-Souza et al., 2004; Gurung e Chettri, 2021), reforçando a importância das abelhas para a citricultura.

Considerando que cisteíno peptidases e cistatinas estão presentes em todas as classes de organismos (Oliveira et al., 2003), propor estratégias de controle com essa interação molecular requer atenção, especialmente devido o possível impacto contra as abelhas. No entanto, ainda que na prática as cistatinas aqui propostas (CsinCPI-2 e CclemCPI-1) precisem ainda ser testadas na prática, contra os principais polinizadores de citros, a princípio, testes realizados com o emprego da cistatina de arroz (*Oryza sativa*) denominada Orizacistatina I (OCI), não interferiu significativamente na longevidade da abelha solitária *Osmia bicornis*, onde confirmou-se que apesar da presença de cisteíno peptidases em tais organismos, há predominância de metalo peptidases e, principalmente, serino peptidases (Konrad et al., 2009). Felizmente, a utilização de OCI em teste com a abelha melífera (africanizada) *A. mellifera*, também não afeta sua longevidade e não interfere na performance de aprendizagem olfatória e não provoca interrupção na proteólise digestiva (Girard et al., 1998). O uso das cistatinas para o controle dos psilídeos associados ao HLB, dessa forma, mostra-se potencialmente aplicável.

Nossos resultados nos permitem inferir que as catepsinas em *D. citri* são alvos cruciais, demonstrando participação em importantes etapas do desenvolvimento do inseto (Ferrara et al., 2015; 2020; Ibanez et al., 2023). Além disso, foi possível compreender que a bactéria CLas pode influenciar na expressão gênica relativa de *DcCathB* e *DcCathL*, e na expressão proteica de *DcCathL*, reforçando a ideia de que tais enzimas são importantes armas na resposta de defesa do psilídeo contra a bactéria CLas. Além da suposta atividade da enzima na resposta imune de *D. citri*, que pode ser associada à sua presença nas glândulas salivares, a *DcCathL* também foi

identificada no ovário, supostamente desempenhando uma atividade embrionária e, principalmente, no intestino médio, evidenciando a sua atividade digestiva. Portanto, testes de dieta artificial provaram ser uma maneira interessante de validar as DcCathB e L como alvos em *D. citri*, devido sua exequibilidade com organismos vivos. Estes testes nos permitiram concluir que as ninfas são mais suscetíveis aos efeitos da inibição de DcCathB e DcCathL quando comparadas aos adultos. Além disso, ninfas CLas - tiveram um aumento significativo de mortalidade quando alimentadas com CsinCPI-2, diferentemente do efeito encontrado para ninfas infectadas com CLas, indicando a influência da bactéria CLas na resposta de *D. citri* em possíveis tratamentos e estratégias de manejo.

As interações *D. citri* -CLas são bem-estabelecidas e bastante complexas. No entanto, os nossos estudos nos permitiram demonstrar que as DcCaths são alvos importantes. Ainda, demonstrou-se que a utilização das cistatinas CclemCPI-1 e CsinCPI-2 para a inibição das catepsinas em *D. citri*, se mostram promissoras para o manejo populacional de *D. citri*. No mais, pode-se inferir que as catepsinas DcCathB e DcCathL são alvos muito promissores e a inibição de sua atividade mediada pelas cistatinas, pode caracterizar uma interferência na relação patógeno-inseto hospedeiro (CLas – *D. citri*) e desestabilizar essa relação, caracterizando uma potencial ferramenta para desacelerar a propagação do inseto vetor do HLB.

6 CONCLUSÃO

-Neste trabalho, realizamos a clonagem das ORFs de *DcCathL*, *CclemCPI-1* e *CsinCPI-2* em vetores para Y2H.

-A avaliação da expressão gênica por qPCR de insetos adultos mostrou uma supressão de *DcCathB* e um aumento na expressão de *DcCathL* na presença de CLas.

- O mesmo padrão de expressão das *DcCathB* e *L*-like foi observado em intestinos de *D. citri* na presença da bactéria CLas, quando avaliados por FISH.

- Baseado na imunolocalização em tecidos de *D. citri*, foi possível concluir que a catepsina *DcCathL* está presente nas glândulas salivares, ovários e intestino do inseto psilídeo, o que reforça a pressuposta atuação desta enzima no sistema imune do inseto hospedeiro, atividade na embriogênese e, principalmente, digestiva.

- A imunolocalização de DcCathL em intestino médio e ovário de *D. citri* indicam, quanto a localização subcelular, que DcCathL é direcionada à região extracelular nestes tecidos em *D. citri*;

-Predições da localização subcelular realizadas *in silico*, sugerem que a localização mais provável para DcCathL é na porção extracelular, com uma menor probabilidade de que esta proteína ocupe o lisossoma da célula. As mesmas análises de predição *in silico* realizadas para DcCathB, indicam que a localização mais provável desta enzima se dá na porção extracelular.

-Foi possível observar uma maior expressão de DcCathL nos tecidos oriundos de insetos infectados por CLas e, isso deve indicar a relação desta proteína na resposta de defesa do psilídeo.

- Um ensaio preliminar nos permitiu observar a eclosão de ovos de *D. citri* em meio de cultivo, em ambiente totalmente artificial.

- Acerca dos ensaios de dieta artificial, os métodos escolhidos foram previamente testados e validados utilizando a proteína GFP recombinante para comprovar a eficiência deste método em entregar a proteína via alimentação para *D. citri*, seja na fase de ninfa quanto de adulto.

- As cistatinas *CsinCPI-2* e *CclemCPI-1* se mostraram altamente eficientes em reduzir as populações de *D. citri* na fase ninfal, quando livres de bactéria. No entanto, populações de insetos adultos ou portadores da bactéria CLas apresentaram redução na sua taxa de sobrevivência, porém, não estatisticamente significativas, requerendo ajustes.

Assim, nossas perspectivas futuras incluem otimizar os ensaios, especialmente para a avaliação dos adultos, buscando aumentar o tempo de observação, considerando que estes insetos são mais ativos e despendem menos tempo se alimentando quando comparados com as ninfas, o que pode estar interferindo nos resultados obtidos. Além disso, deveremos padronizar os estudos de interação proteína-proteína e realizar a localização subcelular da proteína DcCathB.

REFERÊNCIAS

Albiach-Marti, M. The complex genetics of Citrus tristeza virus. **Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications**, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.5772/56122>.

Ambrós, S.; El-Mohtar, C.; Ruiz-Ruiz, S.; Peña, L.; Guerri, J.; Dawson, W. O.; Moreno, P. Agroinoculation of Citrus tristeza virus causes systemic infection and symptoms in the presumed nonhost *Nicotiana benthamiana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 24, n. 10, p. 1119-1131, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-11-0110>

Ambrós, S.; Ruiz-Ruiz, S.; Peña, L.; Moreno, P. A genetic system for Citrus tristeza virus using the non-natural host *Nicotiana benthamiana*: an update. **Frontiers in Microbiology**, v.4, n. 165, 2013. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00165>

Ammar, El-D.; Shatters, R. G.; Hall, D. G. Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associated with Citrus Huanglongbing disease in its psyllid vector using fluorescence in situ hybridization. **Journal of Phytopathology**, v. 159, p. 726–734, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01836.x>

Ammar, E. D.; Ramos, J. E.; Hall, D. G.; Dawson, W. O.; Shatters, R. G. Jr. Acquisition, Replication and Inoculation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* following Various Acquisition Periods on Huanglongbing-Infected Citrus by Nymphs and Adults of the Asian Citrus Psyllid. **PLoS One**, v. 11, n. 7, 2016. e0159594. DOI: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159594>>

Ammar, E. D.; Achor, D.; Levy, A. Immuno-ultrasctructural localization and putative multiplication sites of Huanglongbing bacterium in Asian Citrus Psyllid *Diaphorina citri*. **Insects**, v. 10, n. 12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects10120422>

Atlas Big. World Total Citrus Production By Country. (2023). Disponível em: <https://www.atlasbig.com/en-us/countries-total-citrus-production#google_vignette> Acesso em: 15/01/2024

Bae, C.; Han, S. W.; Song, Y. R.; Kim, B. Y.; Lee, H. J.; Lee, J. M.; Yeam, I.; Heu, S.; Oh, C. S. Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, p. 1219–1229, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2521-1>

Bar-Joseph, M.; Marcus, R.; Lee, R. F. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. **Annual review of phytopathology**, v. 27, p. 291-316, 1989. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.001451>

Bar-Joseph, M.; Dawson, W. O. Citrus Tristeza Virus. **Encyclopedia of Virology**, p. 520-525, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00639-7>

Bassan, M. M.; Angelotti-Mendonça, J.; Alves, G. R.; Yamamoto, P. T.; Filho, F. A. A. M. Selection of reference genes for expression studies in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 6, p. 2623-2629, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1093/jee/tox253>

Bassanezi, R. B.; Lopes, S. A.; de Miranda, M. P.; Wulff, N. A.; Volpe, H. X. L.; Ayres, A. J. Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 251–264, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00343-y>

Barret, A. J.; Kirschke, H. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L. **Methods in Enzymology**, v. 80, p. 535-561, 1981. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)80043-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)80043-2)

Barrett, A. J. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 12, p. 193-196, 1987. Doi: [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(87\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0968-0004(87)90092-2)

Belliure, B.; Janssen, A.; Sabelis, M. W. Herbivore benefits from vectoring plant virus through reduction of period of vulnerability to predation. **Oecologia**, v. 156, p. 797-806, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1027-9>

Bendix, C.; Lewis, J. D. The enemy within: phloem-limited pathogens. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 1, p. 238–254, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1111/mpp.12526>

Benchabane, M.; Schlüter, U.; Vorster, J.; Goulet, M. C.; Michaud, D. Plant Cystatins. **Biochimie**, v. 92, n. 11, p. 1657-1666, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.06.006>

Bennett, C. W.; Costa, A. S. Tristeza disease of citrus. **Journal of Agricultural Research**, v. 78, p. 207-237, 1949.

Biesmeijer, J. C.; Roberts, S. P. M.; Reemer, M.; Ohlemüller, E. M.; Peeters, T.; Schaffers, A. P., et al. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, v. 313, p. 351-354, 2006. DOI: [10.1126/science.1127863](https://doi.org/10.1126/science.1127863)

Bilal, M.; Iqbal, H. M.; Barceló, D. Persistence of pesticides-based contaminants in the environment and their effective degradation using laccase-assisted biocatalytic systems. **Science of the Total Environment**, v. 695, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133896>

BioRender. Disponível em: <BioRender.com> Acesso em 01/12/2023; 12/01/2024; 05/02/2024.

Blanc, S.; Uzest, M.; Drucker, M. New research horizons in vector- transmission of plant viruses. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 483-491. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.008>

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

Bové, J. M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006. Doi: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v88i1.828>

Bové, J. M.; Garnier, M. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. **Plant Science**, v. 163, p. 1083-1098, 2002.

Bruckner, A.; Polge, C.; Lentze, N.; Auerbach, D.; Schlattner, U. Yeast Two-Hybrid, a powerful tool for systems biology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 6, p. 2763-2788, 2009. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms10062763>

Carvalho, F. P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**, v. 6, p. 48-60, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1002/fes3.108>

Castro, H. L. B.; Braga, F. R.; Soares, F. E. F. Potential of plant cysteine proteases against crop pests and animal parasites. **Journal of Natural Pesticide Research**, v. 6, p. 2773-0786, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100049>

Chavez, J. D.; Cilia, M.; Weisbrod, C. R.; Ju, H.J.; Eng, J. K.; Gray, S. M.; Bruce, J. E. Cross-linking measurements of the Potato leafroll virus reveal protein interaction topologies required for virion stability, aphid transmission, and virus-plant interactions. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 5, p. 2968-2981, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1021/pr300041t>

Chen, Y.; Han, Y.; Wang, J.; Hua, M. M.; Gu, C.; Li, G. S.; Zhang, X.; Chen, D. H. Effects of high temperature on Bt proteins expression and nitrogen metabolic physiology in square of Bt cotton at the peak squaring stage. **Ying Yong Sheng Tai Xue Bao**, v.25, n.9, p. 2623-2628, 2014. Chinese. PMID: 25757314.

Cho, W. L.; Tsao, S. M.; Hays, A. R.; Walter, R.; Chen, J. S.; Snigirevskaya, E. S.; Raikhel, A. S. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 19, p. 13311–13321, 1999. Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13311>

Clark, K.; Franco, J. Y.; Schwizer, S.; Pang, Z.; Hawara, E.; Liebrand, T. W. H.; Pagliaccia, D.; Zeng, L.; Gurung, F. B.; Wang, P.; Shi, J.; Wang, Y.; Ancona, V.; Van der Hoorn, R. A. L.; Wang, N.; Coaker, G.; Ma, W. An effector from the Huanglongbing-associated pathogen targets

citrus proteases. **Nature Communications**, v. 9, n. 1718, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04140-9>

CEPEA – Center for Advanced Studies on Applied Economics. Due to orange supply shortage, global juice supply may decrease. (2023). Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/en/opinion/due-to-orange-supply-shortage-global-juice-supply-may-decrease.aspx> Acesso em: 02/02/2024.

Chiba, M.; Reed, J. C.; Prokhnevsky, A. I.; Chapman, E. J.; Mawassi, M.; Koonin, E. V. Carrington, J. C.; Dolja, V. V. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replication. **Virology**, v. 346, p. 7-14, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.068>

Christova, P. K.; Christov, N. K.; Mladenov, P. V.; Imai, R. The wheat multidomain cystatin TaMDC1 displays antifungal, antibacterial, and insecticidal activities in planta. **Plant Cell Reports**, v. 37, p. 923-932, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2279-4>

Coletta-Filho, H. D.; Takita, M. A.; Targon, M. L. P. N.; Machado, M. A. Analysis of 16S rDNA sequences from citrus huanglongbing bacteria reveal a diferente “Ca. Liberibacter” strain associated with citrus disease in São Paulo. **Plant Disease**, v. 8, n. 8, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1094/PD-89-0848>

Constantin, G. D.; Krath, B. N.; MacFarlane, S. A.; Nicolaisen, M.; Elisabeth Johansen, I.; Lund, O. S. Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. **The Plant Journal**, v. 40, p. 622–631, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02233.x>

Cong, Q.; Kinch, L. N.; Kim, B. H.; Grishin, N. V. Predictive sequence analysis of the *Candidatus liberibacter asiaticus* proteome. **PLoS One**, v.7, n. 7, e41071, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041071>

Connors, B. J.; Laun, N. P.; Maynard, C. A.; Powell, W. A. Molecular characterization of a gene encoding a cystatin expressed in the stems of American chestnut (*Castanea dentata*). **Planta**, v. 215, n. 3, p. 510-514, 2002. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0782-9>

Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988. Doi: [10.1093/nar/16.22.10881](https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881)

Cossar, P. J.; Lewis, P. J.; McCluskey, A. Protein-protein interactions as antibiotic targets: a medicinal chemistry perspective. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, p. 469–494, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1002/med.21519>

Costa Lima, A. M. Homopteros. **Insetos do Brasil**, v. 3, p. 1-327. Escola Nacional de Agronomia, 1942.

Cstorer, A.; Ménard, R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, v. 244, p. 486-500, 1994. Doi: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44035-](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44035-2)

[2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44035-2)

Culliney, T.W. Crop losses to arthropods. **Integrated Pest Management Reviews**, In book: *Integrated Pest Management: Pesticide Problems*, v.3, p. 201–225, 2014. Doi: https://doi.org/10.1007/978-94-007-7796-5_8

Dawson, W. O.; Bar-Joseph, M.; Garnsey, S. M.; Moreno, P. Citrus Tristeza Virus: making an Ally from an Enemy. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 137-155, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120012>

Deknock, A.; De Troyer, N.; Houbraken, M.; Dominguez-Granda, L.; Nolinovos, I.; Van Echelpoel, W.; Goethals, P. Distribution of agricultural pesticides in freshwater environment of the Guayas River basin (Ecuador). **Science of the Total Environment**, v. 646, p. 996-1008, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.185>

de Souza Guida, Y.; Meire, R. O.; Torres, J. P.; Malm, O. Air contamination by legacy and current-use pesticides in Brazilian mountains: an overview of national regulations by monitoring pollutant presence in pristine areas. **Environmental Pollution**, v. 242, p. 19-30, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.061>

Dodds, P. N.; Rathjen, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, p.539–548, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrg2812>

Eduardo, W. I.; Miranda, M. P.; Volpe, H. X. L.; Garcia, R. B. G.; Girardi, E. A.; Alquezar, B.; Ruiz, A. E.; Peña, L. Resistance of true citrus species to *Diaphorina citri*. **Pest Management Science**, v. 78, n. 11, p. 4783-4792, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.7098>

El-Mohtar, C.; Dawson, W. O. Exploring the limits of vector construction based on Citrus tristeza virus. **Virology**, v. 448, p. 274-283, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.10.017>

Expasy. ViralZone. Closterovirus. Disponível em: < <https://viralzone.expasy.org/286> > Acesso em: 06/01/2024.

Febres, V. J.; Ashoulin, L.; Mawassi, M.; Frank, A.; Bar-Joseph, M.; Manjunath, K. L.; Lee, R. F.; Niblett, C. L. The p27 protein is present at one end of Citrus Tristeza virus particles. **Molecular Plant Pathology**, v. 86, n. 12, 1996.

Ferrara, T. F. S.; Schneider, V. K.; Kishi, L. T.; Carmona, A. K.; Alves, M. F. M.; Belasque-Júnior, J.; Rosa, J. C.; Hunter, W. B.; Henrique-Silva, F.; Soares-Costa, A. Characterization of a recombinant Cathepsin B-Like cysteine peptidase from *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae): a putative target for control of citrus huanglongbing. **PLoS ONE**, v.10, n. 12, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145132>

Ferrara, T. F. S.; Schneider, V. K.; Lima, P. S.; Bronze, F. S.; Machado, M. F. M.; Henrique-Silva, F.; Soares-Costa, A.; Carmona, A. k. Gene expression. Studies and molecular characterization of a cathepsin L-like from the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*, vector of

Huanglongbing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 375-383, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.070>

Fernandes, K. V. S.; Sabelli, P. A.; Barratt, D. H. P.; Richardson M.; Xavier-Filho, J.; Shewry, P. R. The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. **Plant Molecular Biology**, v. 23, p. 215-219, 1993. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF00021433>

Fields, S.; Song, O. K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature**, v. 340, p. 245-246, 1989. Doi: <https://doi.org/10.1038/340245a0>

Finegold, C.; Ried, J.; Denby, K.; Gurr, S. Global burden of crop loss. **Gates Open Research**, 2019. Doi: <https://doi.org/10.21955/gatesopenres.1116448.1>

Flores, R.; Ruiz-Ruiz, S.; Soler, N.; Sánchez-Navarro, J. Fagoaga, C.; López, C.; Navarro, L. Moreno, P.; Peña, L. Citrus Tristeza virus p23: a unique protein mediating key virus-host interactions. **Frontiers in Microbiology**, sec Virology, v. 4, n. 98, 2013. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00098>

Folimonov, A. S.; Folimonova, S. Y.; Bar-Joseph, M.; Dawson, W. O. A stable RNA virus-based vector for citrus trees. **Virology**, v. 368, p. 205-216, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.06.038>

Folimonova, S. Y. Superinfection exclusion is an active virus-controlled function that requires a specific viral protein. **Journal of Virology**, v. 86, n. 10, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.00310-12>

Folimonova, S. Y. Citrus tristeza virus: A large RNA virus with complex biology turned into a valuable tool for crop protection. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 4, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008416>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Managing Huanglongbing/Citrus Greening Disease in the Caribbean. (2013). Disponível em:

<<https://www.fao.org/publications/card/en/c/99803e1f-c626-4c1d-9bd3-1120cc7abdc9/>>

Acesso em: 16/02/2024.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Citrus Fruit fresh and processed. Statistical Bulletin. (2020). Disponível em: <<https://www.fao.org/3/cb6492en/cb6492en.pdf>> Acesso em: 10/11/2023

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Integrated Pest Management. (2024). Disponível em: <<https://www.fao.org/pest-and-pesticide-management/ipm/integrated-pest-management/en/>>

Acesso em:30/01/2024.

Fu, S.; Shao, J.; Zhou, C.; Hartung, J. S. Transcriptome analysis of sweet orange trees infected with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and two strains of Citrus Tristeza Virus. **BMC Genomics**, v. 17, n. 349, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2663-9>.

Fundecitrus – Fundo de Defesa da Citricultura. Sumário Executivo: Estimativa da safra de laranja 2021/2022 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. (2021). Disponível em: https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2021_05_27_Sum%C3%A1rio_Executivo_da_Estimativa_da_Safra_de_Laranja_2021-2022.pdf

Acesso em: 16/02/2023.

Fundecitrus – Fundo de Defesa da Citricultura. Levantamento da incidência das doenças dos citros no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo / Sudoeste mineiro: Greening, CVC e Cancro cítrico. (2022). Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/Levantamento%20de%20doencas%202022_Relatorio%20completo.pdf> Acesso em: 10/09/2023

Fundecitrus – Fundo de Defesa da Citricultura. Greening avança no cinturão citrícola e demanda ações efetivas do setor para incidência nos pomares. (2023). Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/greening-avanca-no-cinturao-citricola-e-demanda-acoes-efetivas-do-setor-para-reduzir-incidencia-nos-pomares/1359>

Acesso em: 15/02/2023.

Galdeano, D. M.; Breton, M. C.; Lopes, J. R. S.; Falk, B. W.; Machado, M. A. Oral delivery of double-stranded RNAs induces mortality in nymphs and adult of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171847>

Garnsey, S. M.; Gonsalves, D.; Purcifull, D. E. Mechanical transmission of citrus tristeza virus. **Phytopathology**, v.67, p. 965–68, 1977.

Garnsey S. M.; Müller, G. W. Efficiency of mechanical transmission of citrus tristeza virus. Proc. **International Organization of Citrus Virologists**, v. 10, p. 46–54, 1988. Doi: <https://doi.org/10.5070/C50hv429xm>

Ghanim, M.; Fattah-Hosseini, S.; Levy, A.; Cilia, M. Morphological abnormalities and cell death in the Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*) midgut associated with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 33418, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1038/srep33418>

Gianotti, A.; Rios, W. M.; Soares-Costa, A.; Nogaroto, V.; Carmona, A. K.; Oliva, M. L. V.; Andrade, S. S.; Henrique-Silva, F. Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein Expression and Purification**, v. 47, n. 2, p. 483-9, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.10.026>

Gianotti, A.; Sommer, C. A.; Carmona, A. K.; Henrique-Silva, F. Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L and human breast cancer cell invasion. **Biological Chemistry**, v. 389, n. 4, p. 447-53, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1515/BC.2008.035>

Gilbertson, R. L.; Batuman, O.; Webster, C. G.; Adkins, S. Role of the insect superectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. **Annual Review of Virology**, v. 2, p. 67-93, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085410>

Girard, C., Picard-Nizou, AL., Grallien, E. *et al.* Effects of Proteinase Inhibitor Ingestion on Survival, Learning Abilities and Digestive Proteinases of the Honeybee. **Transgenic Research**, v. 7, p. 239–246, 1998. Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1008813910751>

Giron, D.; Huguet, E.; Stone, G. N.; Body, M. Insect-induced effects on plants and possible effectors used by galling and leaf-mining insects to manipulate their host-plant. **Journal of Insect Physiology**, v. 84, p. 70–89, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.12.009>

Gowda, S., Satyanarayana, T., Robertson, C.J., Garnsey, S.M., Dawson, W.O. Infection of citrus plants with virions generated in *Nicotiana benthamiana* plants agroinfiltrated with binary vector based Citrus tristeza virus. **Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists**. IOCV, Riverside, CA, p. 23-33, 2005. Doi: 10.5070/C59CW9M5CD

Gottwald, T. R. Current epidemiological understanding of Citrus huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 119-139, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114418>

Grafton-Cardwell, E. E.; Stelinski, L. L.; Stansly, P. A. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 413-432, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153542>

Gray, S.; Cilia, M.; Ghanim, M. Chapter four- Circulative, “nonpropagative” virus transmission: an orchestra of virus-, insect-, and plant- derived instruments. **Advances in Virus Research**, v. 89, p. 141-199, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800172-1.00004-5>

Grimsley, N.; Hohn, B.; Hohn, T.; Walden, R. Agroinfection, an alternative route for viral-infection of plants by using the Ti plasmid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS**, v. 83, n. 10, p. 3282-3286, 1986. Doi: 10.1073/pnas.83.10.3282

Gruden, K.; Zhang, Y.; Tong, J.; Ge, P.; Wang, Q.; Zhao, Z.; Zhu-Salzman, K.; Hogenhout, S. A.; Ge, F.; Sun, Y. The cysteine protease activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa*

decemlineata Say) guts, which is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, p. 549-60, 1998. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(98\)00051-4](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(98)00051-4)

Guo, H.; Zhang, Y.; Tong, J.; Ge, P.; Wang, Q.; Zhao, Z.; Zhu-Salzman, K.; Hogenhout, S. A.; Ge, F.; Sun, Y. An aphid-secreted salivary protease activates plant defense in phloem. **Current Biology**, v. 30, p. 4826-4836, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.020>

Gurung, S.; Chettri, A. Threat to *Citrus* in a global pollinator decline scenario: current understanding of its pollination requirements and future directions. In: Plant Reproductive Ecology – Recent Advances, 2021. Doi: [10.5772/intechopen.101159](https://doi.org/10.5772/intechopen.101159)

Haq, S. K.; Atif, S. M.; Khan, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 431, p. 145-159, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.07.022>

Hajeri, S.; Killiny, N.; El-Mohtar, C.; Dawson, W.O.; Gowda, S. Citrus tristeza virus-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). **Journal of Biotechnology**, v. 176, p.42–49, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.02.010>

Hall, D. G. Biology, history and world status of *Diaphorina citri*. I **Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus Liberibacter spp*) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*)**. (2008) Disponível em: <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/35403/HallDiaphorinabiologyhistoryworldstatus2008.pdf> Acesso em: 20/01/2024

Hall, D. G.; Richardson, M. L.; Ammarett, E.; Halbert, S. E. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 146, p. 207–223, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1111/eea.12025>

Halbert, S.; Manjunath, K. L. Asian Citrus psyllid (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of Citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, v. 87, n. 3, p. 330-353, 2004.

Hogenhout, S. A.; Ammar, El-D.; Whitfield, A. E.; Redinbaugh, M. G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 327– 359, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.022508.092135>

Hu, Y.; Zhong, X.; Liu, X.; Lou, B.; Zhou, C.; Wang, X. Comparative transcriptome analysis unveils the tolerance mechanisms of Citrus hystrix in response to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189229>.

Huang, W.; Reyes-Caldas, P.; Mann, M.; Seifbarghi, S.; Kahn, A.; Almeida, R. P. P.; Béven, L.; Heck, M.; Hogenhout, S. A.; Coaker, G. Bacterial vector-borne plant diseases: unanswered questions and future directions. **Molecular Plant**, v. 13, p. 1379-93, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.08.010>

Ibanez, F.; Rocha, S. V.; Dawson, W. O.; El-Mohtar, C.; Robertson, C.; Stelinski, L. L.; Soares-Costa, A. Gene silencing of cathepsins B and L using CTV-based, plant-mediated RNAi interferes with ovarial development in Asian citrus psyllid (ACP), *Diaphorina citri*. **Frontiers in Plant Science**, sec. Plant Pathogen Interactions, v. 14, 2023. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1219319>

Inoue, H.; Ohnishi, J.; Ito, T.; Tomimura, K.; Miyata, S.; Iwanami, T.; Ashihara, W. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology**, v. 155, p. 29-36, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2009.00317.x>

Ito, T.; Chiba, T.; Ozawa, R.; Yoshida, M.; Hattori, M.; Sakaki. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS**, v. 98, p. 4569–4574, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.061034498>

Izumi, S.; Yano, K.; Yamamoto, Y.; Takahashi, S. Y. Yolk proteins from insect eggs: Structure, biosynthesis and programmed degradation during embryogenesis. **Journal of Insect Physiology**, v. 40, n. 9, p. 735–746, 1994. Doi: [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(94\)90001-](https://doi.org/10.1016/0022-1910(94)90001-9)

9

Jaiswal, D.; Sidhanarthan, V. K.; Sharma, S. K.; Rai, R.; Choudhary, N.; Ghosh, A.; Baranwal, V. K. *Candidatus Liberibacter asiaticus* manipulates the expression of vitellogenin, cytoskeleton, and endocytic pathway-related genes to become circulative in its vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **3 Biotech**, v. 11, n. 88, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02641-x>

Jagoueix, S.; Bové, J. M.; Garnier, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 379-386, 1994. Doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-379>

Jiang, Y.; Jiang, L.; Akhil, C. S.; Wang, D.; Zhang, Z.; Zhang, W.; Xu, D. MULocDeep web service for protein localization prediction and visualization at subcellular and suborganellar levels. *Nucleic Acids Research J.* Volume 51, Issue W1, 5 July 2023, Pages W343-W349. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkad374>.

Jouanin, L.; Goujon, T.; De Nadaï, V.; Martin, M.T.; Mila, I.; Vallet, C.; Pollet, B.; Yoshinaga, A.; Chabbert, B.; Petit-Conil, M.; Lapierre, C. Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity. **Plant Physiology**, v. 123, n. 4, p. 1363-1374, 2000. Doi: <https://doi.org/10.1104/pp.123.4.1363>

Karasev, A. V., Boyko, V. P.; Gowda, S.; Nikolaeva, O. V.; Hilf, M. E., Koonin, E. V.; Niblett, C. L.; Cline, K.; Gumpf, D. J.; Lee, R. F.; Garnsey, S. M.; Lewandowski, D. J.; Dawson, W. O. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. **Virology**, v. 208, p. 511-520, 1995. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1182>

Khan, A. M.; Ashfaq, M.; Kiss, Z.; Khan, A. A.; Mansoor, S.; Falk, B. W. Use of recombinant tobacco mosaic virus to achieve RNA interference in plants against the citrus mealybug, *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae). **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073657>

Khan, A. M.; Ashfaq, M.; Khan, A. A.; Rasool, A.; Iqbal, J.; Mansoor, S. Inoculation of *Nicotiana tabacum* with recombinant potato virus X induces RNA interference in the solenopsis mealybug, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). **Biotechnology Letters**, v. 37, p. 2083–2090, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1880-7>

Killiny, N.; Harper, S. J.; Alfaress, S.; El Mohtar, C.; Dawson, W. O. Minor coat and heat shock proteins are involved in the binding of Citrus tristeza virus to the foregut of its aphid vector, *Toxoptera citricida*. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, p. 6294–302. 2016. Doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01914-16>

Killiny, N. Made for Each Other: Vector–Pathogen Interfaces in the Huanglongbing Pathosystem. **Phytopathology®**, v. 112, n. 1, p. 26-43, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-21-0182-FI>

Klein, A. M.; Vaissiere, B. E.; Cane, J. H.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S. A.; Kremen, C, et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 274, p. 303-313, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>

Kliot, A.; Kontsedalov, S.; Lebedev, G.; Brumin, M.; Cathrin, P. B.; Marubayashi, J. M.; Skaljac, M.; Belausov, E.; Czosnek, H.; Ghanim. Fluorescence in situ hybridizations (FISH) for the localization of viruses and endosymbiotic bacteria in plant and insect tissues. **Journal of Visualized Experiments**, v. 84, 2014. e51030, DOI:10.3791/51030

Knoema. Citrus fruit production quantity. (2020). Disponível em: <<https://knoema.com/atlas/topics/Agriculture/Crops-Production-Quantity-tonnes/Citrus-fruit-production>> Acesso em: 07/02/21

Kolliopoulou, A.; Taning, C.N.; Smagghe, G.; Swevers, L. Viral delivery of dsRNA for control of insect agricultural pests and vectors of human disease: Prospects and challenges. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. 399, 2017. Doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00399>

Konrad, R.; Connor, M.; Ferry, N.; Angharad M. R.; Babendreier, G. D. Impact of transgenic oilseed rape expressing oryzacystatin-1 (OC-1) and of insecticidal proteins on longevity and digestive enzymes of the solitary bee *Osmia bicornis*, *Journal of Insect Physiology*, v. 55, n. 4, p. 305-313, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.12.007>

Kruse, A.; Fattah-Hosseini, S.; Saha, S.; Johson, R.; Warwick, E. R.; Sturgeon, K.; Mueller, L.; MacCoss, M. J.; Shatters, R. G.; Heck, M. C. Combining ‘omics and microscopy to visualize interactions between the Asian citrus psyllid vector and the Huanglongbing pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the insect gut. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6: e0179531, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179531>

Kühner, S.; Noort, V. V.; Betts, M. J.; Leo-Macias, A.; Batisse, C.; Rode, M.; Yamada, T.; Majer, T.; Bader, S.; Beltrán-Alvarez, P.; Castaño-Diez, D.; Chen, W. H.; Devos, D.; Guell, M.; Norambuena, T.; Racke, I.; Rybin, V.; Schmidt, A.; Yus, E.; Aebersold, R.; Herrmann, R.; Bottcher, B.; Frangakis, A. S.; Russell, R. B.; Serrano, L.; Bork, P.; Gavin, A C. Proteome organization in a genome-reduced bacterium. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1235–1240, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.1176343>

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970. Doi: <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Lawrence, P. K.; Koundal, K. R. Plant Protease Inhibitors in Control of Phytophagous Insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 93-109, 2002.

Lee, K. S.; Kim, B. Y.; Choo, Y. M.; Yoon, H. J.; Kang, P. D.; Woo, S. D.; Sohn, H. D.; Roh, J. Y.; Gui, Z. Z.; Je, Y. H.; Jin, B. R. Expression profile of cathepsin B in the fat body of *Bombyx mori* during metamorphosis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 154, n. 2, p. 188–194, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.06.002>

Lee, W. S.; Hammond-Kosack, K. E.; Kanyuka, K. Barley stripe mosaic virus-mediated tools for investigating gene function in cereal plants and their pathogens: Virus-induced gene silencing, host-mediated gene silencing, and virus-mediated overexpression of heterologous protein. **Plant Physiology**, v. 160, n. 2, p. 582–590, 2012. Doi: 10.1104/pp.112.203489

Leguizamón, N. D. P.; Rodrigues, E. M.; De Campos, M. L.; Nogueira, A. V. B.; Viola, K. S.; Schneider, V. K.; Neo-Justino, D. M.; Tanomaru-Filho, M.; Zambuzzi, W. F.; Henrique-Silva, F.; Soares-Costa, A.; Faria, G.; Cirelli, J. A. In vivo and in vitro anti-inflammatory and pro-osteogenic effects of citrus Cystatin CsinCPI-2. **Cytokine**, v. 123, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154760>

Lemaitre, B.; Hoffmann, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 697–743, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>

Levy, A.; El-Mohtar, C.; Wang, C.; Goodin, M.; Orbovic, V. A new toolset for protein expression and subcellular localization studies in citrus and its application to citrus Tristeza virus proteins. **Plant Methods**, v.14, n. 2, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0270-7>

Livak, K. K.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408. Doi: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Lipke, H.; Fraenkel, G.S; Liener, J.E. Effects of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, p. 410-415, 1954. Doi: **10.1021/jf60028a003**

Liu, Y. P.; Peremyslov, V. V.; Medina, V.; Dolja, V. V. Tandem leader proteases of Grapevine leafroll-associated virus-2: host-specific functions in the infection cycle. **Virology**, v. 383, n.2, p. 291-299, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.09.035>

Lough, T. J.; Lucas, W. J. Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 203-232, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144145>

Lu, R.; Malcuit, I.; Moffett, P.; Ruiz, M. T.; Peart, J.; Wu, A. J.; Rathjen, J. P.; Bendahmane, A.; Day, L.; Baulcombe, D. C. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 21, p. 5690–5699, 2003. Doi: 10.1093/emboj/cdg546

Manjunath, K. L.; Halbert, S. E.; Ramadugu, C.; Webb, S.; Lee, R.F. Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. **Bacteriology**, v. 98, v. 4, p.387-396, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-4-0387>

Martins, J. R.; Bitondi, M. M. G. Nuclear immunolocalization of hexamerins in the fat body of metamorphosing honey bees. **Insects**, v. 3, p. 1039-1055, 2012. Doi: <https://doi.org/10.3390/insects3041039>

Martinez, M.; Diaz, I. The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 198, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-198>

Martinez, M.; Cambra, I.; Carrillo, L; Diaz-Mendoza, M.; Diaz, I. Characterization of entire cystatin gene Family in Barley and their target cathepsin L-like Cysteine-proteases, partners in the hordein mobilization during seed germination. **Plant Physiology**, v. 151, p. 1531-1545, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1104/pp.109.146019>

Martinez, M.; Santamaria, M. E.; Diaz-Mendoza, M.; Arnaiz, A.; Carrillo, L.; Ortego, F.; Diaz, I. Phycystatins: Defense proteins against phytophagous insects and acari. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1747, 2016. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms17101747>

Martinelli, A. F.; Uratsu, S. L.; Albrecht, U.; Reagan, R. L.; Phu, M. P.; Britton, M.; Buffalo, V.; Fass, J.; Leicht, E.; Zhao, W.; Lin, D.; D'Souza, R.; Davis, C. E.; Bowman, K. D.; Dandekar, A. M. Transcriptome profiling of citrus fruit response to Huanglongbing disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038039>.

Matsumoto, Y.; Hattori, M. The green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae), salivary protein NcSP75 is a key effector for successful phloem ingestion. **PLoS One**, v. 13, e0202492, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202492>

McCleanc, A. P. D.; Schwarz, R. E. Greening or blotchy-mottle disease of citrus. **Phytophylactica**, v.2(3), p. 177-194, 1970. Doi: https://hdl.handle.net/10520/AJA03701263_447

McManus, M. T.; Burgess, E. P. J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology**, v. 41, n.9, p. 731-738, 1995. Doi: [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(95\)00043-T](https://doi.org/10.1016/0022-1910(95)00043-T)

Medina, M.; León, P.; Vallejo, C. G. *Drosophila* cathepsin B-like proteinase: A suggested role in yolk degradation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 263, p. 355– 363, 1988. Doi: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90646-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90646-7)

Merfa, M. V.; Pérez-López, E.; Naranjo, E.; Jain, M.; Gabriel, D. W.; De La Fuente, L. Progress and Obstacles in Culturing ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, the Bacterium Associated with Huanglongbing. **Phytopathology®**, v. 109, n. 7, p. 1092-1101, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-19-0051-RVW>

Moreira, S. Observações sobre a "tristeza" dos citrus ou podridão das radículas. **O Biológico**, v. 8, p. 269-276, 1942.

Moreno, P.; Ambros, S.; Albiach-Marti, M. R.; Guerri, J.; Pena, L. Plant diseases that changed the world - Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry.

Molecular Plant Pathology, v. 9, n. 251-268, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00455.x>

Müller, G. W. Use of mild strains of citrus tristeza virus (CTV) to reestablish commercial production of Pera sweet orange in São Paulo, Brazil. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 93, p. 62-64, 1980.

Nachappa, P.; Shapiro, A. A.; Tamborindeguy, C. Effect of *Candidatus* Liberibacter solanacearum on fitness of its insect vector, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), on Tomato. **Phytopathology**, v. 102, n. 1, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-11-0084>

Neves, M.F.; Trombin, V.G. Anuário da citricultura 2017. São Paulo: CitrusBR. 57 p., 2017. Disponível em: https://citrusbr.com/wp-content/uploads/2020/09/revista_citrus_1217.pdf
Acesso em: 08/02/2024

Malerbo-Souza, D. T.; Nogueira-Couto, R. H.; Couto, L. A. Honey bee attractants and pollination in sweet orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, var. pera-rio. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. 144-153, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1678-91992004000200004>

Murdock, L. L.; Brookhart, G.; Dunn, P. E.; Foard, D. E.; Kelley, S.; Kitch, L.; Shade, R. E.; Shukle, R. H.; Wolfson, J. L. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 87, n. 4, p. 783-787, 1987. Doi: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(87\)90388-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(87)90388-9)

Mutti, N. S.; Louis, J.; Pappan, L. K.; Pappan, K.; Begum, K.; Chen, M. S.; Park, Y.; Dittmer, N.; Marshall, J.; Reese, J. C.; Reeck, G. R. A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – PNAS**, v. 105, n. 9, p. 9965–9969, 2008. Doi: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0708958105

Naessens, E.; Fubreuil, G.; Giordanengo, O.; Baron, L.; Minet-Kebdani, N.; Keller, H.; Coustau, C. A Secreted MIF Cytokine Enables Aphid Feeding and Represses Plant Immune

Responses. **Current Biology**, v. 25, p. 1898–903, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.047>

Nault, L. R.; Ammar, El-D. Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 503–529, 1989. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.34.010189.002443>

Ng, J. C. K.; Falk, B. W. Virus-vector interactions mediating non persistent and semipersistent transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**. v. 44, p. 183–212, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143325>

Oliveira, A. S.; Xavier-Filho, J. Sales, M. P. Cysteine proteinases and cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 1, p. 91-104, 2003. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132003000100014>

Omasits, U.; Ahrens, C. H.; Müller, S.; Wollscheid, B. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic. **Bioinformatics**, v. 30, n. 6, p. 884-886, 2014. Doi: [10.1093/bioinformatics/btt607](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt607)

Orlovskis, Z.; Canale, M. C.; Thole, V.; Pecher, P.; Lopes, J. R. S.; Hogenhout, S. A. Insect-borne plant pathogenic bacteria: getting a ride goes beyond physical contact. **Current Opinion in Insect Science**, v. 9, p. 16–23, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.007>

Outchkourov, N. S.; De Kogel, W. J.; Schuurman De Bruin, A.; Abrahamson, M.; Jongsma, M. A. Specific cysteine protease inhibitors act as deterrents of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in transgenic potato. **Plant Biotechnology Journal**, v. 2, n. 5, p. 439-448, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00088>

Padgett, H. S.; Epel, B. L.; Kahn, T. W.; Heinlein, M.; Watanabe, Y.; Beachy, R. N. Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. **The plant journal**, v. 10, n. 6, 1996. Doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10061079.x>

Papolu, P. K.; Dutta, T. K.; Tyagi, N.; Urwin, E. P.; Lilley, C. J.; Rao, U. Expression of a cystatin transgene in eggplant provides resistance to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Frontiers in Plant Science**, sec Plant Pathogen Interactions, v. 7, n. 1122, 2016. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01122>

Parra, J. R. P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. In: PANIZZZI, A.R. PARRA, J.R.P. (Eds). Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. São Paulo: Manole, 1991. Cap.2, p. 9-65.

Pande, Y. D. Biology of Citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae). Israel Journal of Entomology, v. 6, 1971.

Pelz-Stelinski, K. S.; Brlansky, R. H.; Ebert, T. A.; Rogers, M. E. Transmission Parameters for *Candidatus* Liberibacter asiaticus by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 5, p. 1531–1541, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1603/EC10123>

Pelz-Stelinski, K. S., Brlansky, R. H., Ebert, T. A., Rogers, M. E. Transmission parameters for *Candidatus* Liberibacter asiaticus by asian citrus psyllid (Hemiptera: psyllidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 1531–1541, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1603/EC10123>

Perilla-Henao, L. M.; Casteel, C. L. Vector-borne bacterial plant pathogens: interactions with Hemipteran insects and plants. **Frontiers in Plant Science**, sec Plant Pathogen Interactions, v. 7, n. 1163, 2016. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01163>

Pérez-Lucas, G.; Vela, N.; El Aatik, A.; Navarro, S. Environmental risk of groundwater pollution by pesticide leaching through the soil profile. **Pesticides - Use Misuse their Impact Environmental**, p. 1-28, 2019. Doi: [10.5772/intechopen.82418](https://doi.org/10.5772/intechopen.82418)

Pimentel, A. C.; Dias, R. O.; Bifano, T. D.; Genta, F. A.; Ferreira, C.; Terra, W. R. Cathepsins L and B in *Dysdercus peruvianus*, *Rhodnius prolixus*, and *Mahanarva fimbriolata*. Looking for enzyme adaptations to digestion. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 103488, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103488>

Pinheiro, P. V.; Ghanin, M.; Alexander, M.; Rebelo, A. R.; Santos, R. S.; Orsburn, B. C.; Gray, S.; Cilia, M. Host plants indirectly influence plant virus transmission by altering gut cysteine protease activity of aphid vectors. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 16, n. 4, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.063495>

Purcell, A. H. Insect vector relationships with procaryotic plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 20, p. 397-417, 1982. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.20.090182.002145>

Purcell, A. H. Paradigms: Examples from the bacterium *Xylella fastidiosa*. **Annual Review of Plant Phytopathology**, v. 51, p. 339-356, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102325>

Rain, J. C.; Selig, L.; De Reuse, H.; Battaglia, V.; Reverdy, C.; Simon, S.; Lenzen, G.; Petel, F.; Wojcik, J.; Schachter, V.; Chemama, Y.; Labigne, A.; Legrain, P. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. **Nature**, v. 409, p. 211–215, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1038/35051615>

Ramsey, J. S.; Chavez, J. D.; Johnson, R.; Hosseinzadeh, S.; Mahoney, J. E.; Mohr, J. P.; Robison, F.; Zhong, X.; Hall, D. G.; MacCoss, M.; Bruce, J.; Cilia, M. Protein interaction networks at the host-microbe interface in *Diaphorina citri*, the insect vector of the citrus greening pathogen. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 2 (160545), 2017. Doi: <https://doi.org/10.1098/rsos.160545>

Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V. V. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998. Doi: <https://doi.org/10.1128/mubr.62.3.597-635.1998>

Ratcliff, F.; Martin-Hernandez, A. M.; Baulcombe, D. C. Technical advance: Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. **The Plant Journal**, v. 25, n. 2, p. 237–245, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2000.00942.x>

Rawlings, N. D.; Barret, A. J. Families of cysteine peptidases. **Methods in Enzimology**, v. 244, p. 461-486, 1994. Doi: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44034-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44034-4)

Rawlings, N. D.; Barret, A. J. Introduction: serine peptidases and their clans and family. Introduction: serine peptidases and their clans. In: Barret, A. J.; Rawlings, N. D.; Woessner, J.F. *The Handbook of Proteolytic Enzymes*, London: **Elsevier Academic Press**, chap. 67, p. 1417-1438, 2004.

Rawlings, N. D.; Barrett, A. J.; Thomas, P. D.; Huang, X.; Bateman, A.; Finn, R. D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Research**, v. 46, D624-D632, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>

Reis, E. M.; Margis, R. Sugarcane phytocystatins: identification, classification and expression pattern analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 291-296, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572001000100038>

Ribeiro, C. W.; Soares-Costa, A.; Falco, M. C.; Chabregas, S. M.; Uilan, E. C.; Cotrin, S. S.; Carmona, A. K.; Santana, L. A.; Oliva, M. L. V.; Henrique-Silva, F. Production of a His-Tagged canecystatin in transgenic sugarcane and subsequent purification. **Biotechnology Progress**. v. 24, p. 1060-1066, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1002/btpr.45>

RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R [Internet]. Boston, MA; 2020. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>

Robertson, C. J.; Garnsey, S. M.; Satyanarayana, T.; Folimonova, S.; Dawson, W. O. Efficient infection of Citrus Plants with different cloned constructs of Citrus tristeza virus amplified in *Nicotiana benthamiana* protoplasts. **International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)**, v.16, n. 16, p. 187-195, 2005.

Roistacher, C. N.; Da Graça, J. V.; Müller, G. W. “Cross protection against Citrus tristeza virus – a review, Cross protection against Citrus tristeza virus – a review. **Proceeding Conference**

of the International Organization of Citrus Virology, 17th. eds Hilf M. E., Timmer L. W., Milne R. G., da Graça J. V. (Riverside, CA: IOCV) 1–27, 2010.

Rousis, N. I.; Denardou, M.; Alygizakis, N.; Galani, A.; Bletsou, A. A.; Damala, S.; Thomaidis, N. S. Assessment of environmental pollution and human exposure to pesticides by wastewater analysis in a seven-year study in Athens, Greece. **Toxics**, v. 9, n. 10, 2021. Doi: <https://doi.org/10.3390/toxics9100260>

Ryan, C. A. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review Phytopathology**, v. 28, p. 425-449, 1990. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.28.090190.002233>

Sajid, M.; McKerrow, J. H. Cysteine proteases of parasite organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1-21, 2002. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00438-8](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00438-8)

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1989. 2ed, 1546 p. University of Texas South Western Medical Center, USA.

Santiago, A. C.; Khan, Z. N.; Miguel, M. C.; Gironde, C. C.; Soares-Costa, A.; Pelá, V. T.; Leite, A. L.; Edwardson, J. M.; Buzalaf, M. A. R.; Henrique-Silva, F. A New Sugarcane Cystatin Strongly Binds to Dental Enamel and Reduces Erosion. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 9, p. 1051-1057, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1177/0022034517712981>

Santos-Ortega, Y.; Killiny, N. In vitro egg hatching of *Diaphorina citri*, the vector of Huanglongbing. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 168, p. 851-856, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/eea.12990>

Satyanarayana, T.; Gowda, S.; Boyko, V. P.; Albiach-Marti, M. R.; Mawassi, M.; Navas-Catillo, J.; Karasev, A. V.; Dolja, V.; Hilf, M. E.; Lewandowski, D. J.; Moreno, P.; Bar-Joseph, M.; Garnsey, S. M.; Dawson, W. O. An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences of the United States of America – PNAS, V. 96, N. 13, P. 7433-7438, 1999. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.743>

Satyanarayana, T.; Bar-Joseph, M.; Mawassi, M.; Albiach-Marti, M. R.; Ayllón, M. A.; Gowda, S.; Hilf, M. E.; Moreno, P.; Garmsey, S. M.; Dawson, W. O. Amplification of Citrus tristeza virus from a cDNA clone and infection of citrus trees. **Virology**, v. 280, p. 87-96, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0759>

Schneider, H. The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. **International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)**, v. 1, 1957. Doi: <https://doi.org/10.5070/C50mj6r1sn> Recuperado de: <https://escholarship.org/uc/item/0mj6r1sn>

Schneider, V. K.; Soares-Costa, A.; Chakravarthi, M.; Ribeiro, C.; Chabregas, S. M.; Falco, M. C.; Henrique-Silva, F. Transgenic sugarcane overexpressing CaneCPI-1 negatively affects the growth and development of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Plant Cell Reports**, v. 36, p. 193-201, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2071-2>

Schneider, V. K.; Ferrara, T. F. S.; Rocha, S. V.; Júnior, C. D. S.; Neo-Justino, D. M.; da Cunha, A. F.; da Silva, J. P. M. O.; Tersariol, I. L. S.; Carmina, A. K.; Henrique-Silva, F.; Soares-Costa, A. Recombinant expression, characterization and phylogenetic studies of novel cystatins like proteins of sweet orange (*Citrus sinensis*) and clementine (*Citrus clementina*), **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 546-553, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.280>

Schweppe, D. K.; Harding, C.; Chavez, J. D.; Wu, X.; Ramage, E.; Sing, P. K.; Manoil, C.; Bruce, J. Host-microbe protein interactions during bacterial infection. **Chemistry & Biology**, v. 22, n. 11, p. 1521-30, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.09.015>

Selitrennikoff, C. P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology®**, v. 67, n. 7, p. 2883-2894, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2883-2894.2001>

Shiba, H., Uchida, D., Kobayashi, H., and Natori, M. Involvement of cathepsin B- and L-like proteinases in silk gland histolysis during metamorphosis of *Bombyx mori*. **Archives of**

Biochemistry and Biophysics, v. 390, n. 1, p. 28–34, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2343>

Singh, S.; Singh, A.; Kumar, S.; Mittal, P.; Singh, I. K. Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. **Insect Science**, v. 27, n. 2, p. 186-201, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12641>

Shivprasad, S.; Pogue, G. P.; Lewandowski, D. J.; Hidalgo, J.; Donson, J.; Grill, L. K.; Dawson, W. Foreign gene expression in Tobacco Mosaic virus-based vectors. **Virology**, v. 255, n. 2, p. 312-323, 1999. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9579>

Soares-Costa, A.; Beltramini, L. M.; Thiemann, O. H.; Henrique-Silva, F. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 296, n. 5, p. 1194-1199, 2002. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02046-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02046-6)

Song, I.; Taylor, M.; Baker, K.; Bateman Jr, R. C. Inhibition of cysteine proteinases by *Carica papaya* cystatin produced in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 162, n. 2, p. 221-224, 1995. Doi: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00258-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00258-8)

Stout, M. J.; Thaler, J. S.; Thoma, B. P. H. J. Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 663-689, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151117>

Takara Bio USA. Matchmaker ® Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual. Disponível em: <<https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/Matchmaker%20Gold%20Yeast%20Two-Hybrid%20System%20User%20Manual.pdf>> Acesso em: 15/12/2023

Takahashi, N.; Kurata, S.; and Natori, S. Molecular cloning of cDNA for the 29 kDa proteinase participating in decomposition of the larval fat body during metamorphosis of *Sarcophaga*

peregrina (flesh fly). **FEBS Letters**. v. 334, n. 2, p. 153–157, 1993. Doi: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81702-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81702-2)

Tanaka, F. A.; Coletta-Filho, H. D.; Alves, K. C. S.; Spinelli, M. O.; Machado, M. A.; Kitajima, E. W. Detection of the “*Candidatus Liberibacter americanus*” in phloem vessels of experimentally infected *Cataranthus roseus* by scanning electron microscopy. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 6, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000600013>

Tavares, C. S.; Bonning, B. C. Mpp51Aa1 toxicity to *Diaphorina citri* nymphs demonstrated using a new, long-term bioassay method. **Journal of Invertebrate Pathology**, 195, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2022.107845>

Teixeira, D. C.; Danet, J. L.; Eveillard, S.; Martins, E. C.; Junior, W. C. J.; Yamamoto, P. T.; Lopes, S. A.; Bassanezi, R. B.; Ayres, A. J.; Saillard, C.; Bové, J. M. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the ‘*Candidatus*’ *Liberibacter* species associated with disease. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 173-179, 2005a. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.11.002>

Teixeira, D. C.; Saillard, C.; Eveillard, S.; Danet, J. L.; da Costa, P. I.; Ayres, A. J.; Bové, J. M. ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1857-62, 2005b. Doi: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63677-0>

Teixeira, D. C.; Wulff, N. A.; Lopes, S. A.; Yamamoto, P. T.; Miranda, M. P.; Spósito, M. B.; Belasque-Júnior, J.; Bassanezi, R. B. Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 3, p. 115-128, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.5935/2236-3122.20100012>

Terra, W. R.; Ferreira, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 109, p. 1–62, 1994. Doi: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90141-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90141-4)

Thumuluri, V.; Armenteros, J. J. A.; Johansen, A. R.; Nielsen, H.; Winther, O. DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. W1, p. w228-w234, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac278>

Tipu, M. M. H.; Masud, M. M.; Jahan, R.; Baroi, A.; Hoque, A. K. M. A. Identification of citrus greening based on visual symptoms: a grower's diagnostic toolkit. **Heliyon**, v. 7, n. 11, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08387>

Tsai, J.H. and Y.H. Liu. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 6, p. 1721-1725, 2000. Doi: <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.6.1721>

Turgeon, R. Phloem loading: how leaves gain their independence. **BioScience**, v. 56, n. 1, p. 15-24, 2006. Doi: [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2006\)056\[0015:PLHLGT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2006)056[0015:PLHLGT]2.0.CO;2)

USDA- United States Department of Agriculture (Foreign Agricultural Service). Citrus: World markets and trade. 2021. Disponível em: https://usdabrazil.org.br/wp-content/uploads/2021/01/Citrus-Annual_Sao-Paulo-ATO_Brazil_12-15-2020.pdf Acesso em: 06/29/21

Valadares, N. F.; Dellamano, M.; Soares-Costa, A.; Henrique-Silva, F.; Garratt, R. C. Molecular determinants of improved cathepsin B inhibition by new cystatins obtained by DNA shuffling. **BMC Structural Biology**, v. 10, p. 30, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1186/1472-6807-10-30>

van der, J. P. S.; Vaage, N. S. Pollinators and global food security: The need for holistic global stewardship. **Food Ethics**, v. 1, p. 75-91, 2016. DOI 10.1007/s41055-016-0003-z

Verma, S.; Dixit, R.; Pandey, C. K. Cysteine proteases: modes of activation and future prospects as pharmacological targets. **Frontiers in Pharmacology**, sec Experimental Pharmacology and Drug Discovery, v. 7, n. 107, 2016. Doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00107>

Vidaki, E.; Javoršek, U.; Visovišek, M.; Turk, B. Cysteine cathepsins and their extracellular roles: shaping the microenvironment. **Cells**, v. 8, n. 264, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3390/cells8030264>

Vorster, B. J.; Schluter, U.; Plessis, M. D.; Wyk, S. V.; Makgopa, M. E.; Ncube, I.; Quain, M. D.; Kunert, K.; Foyer, C. H. The cysteine protease-cysteine protease inhibitor system explored in soybean nodule development. **Agronomy**, v. 3, p. 550-570, 2013. Doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy3030550>

Vyas, M.; Fisher, T. W.; He, R.; Nelson, W.; Yin, G.; Cicero, J. M.; Willer, M.; Kim, R.; Kramer, R.; May, G. A.; Crow, J. A.; Soderlund, C. A.; Gang, D. R.; Brown, J. K. Asian Citrus Psyllid Expression Profiles Suggest *Candidatus* Liberibacter Asiaticus-Mediated Alteration of Adult Nutrition and Metabolism, and of Nymphal Development and Immunity. **PLoS ONE**, v.10, n.6, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130328>

Waldron, C.; Wegrich, L. M.; Merlo, P. A. O.; Walsh, T. A. Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor. **Plant Molecular Biology**, v. 23, p. 801-12, 1993. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF00021535>

Wang, N., and Trivedi, P. Citrus Huanglongbing: A Newly Relevant Disease Presents Unprecedented Challenges. **Phytopathology**, v. 103, p. 652–665, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-12-0331-RVW>

Walling, L. L. Avoiding effective defenses: strategies employed by phloem-feeding insects. **Plant Physiology**, v. 146, p. 859–866, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1104/pp.107.113142>

Wang, J.; Turina, M.; Stewart, L.R.; Lindbo, J.A.; Falk, B.W. Agroinoculation of the crinivirus, lettuce infectious yellows virus, for systemic plant infection. **Virology**, v. 392, p. 131–136, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.06.034>

Wiederanders, B. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 3, p. 691-713.

Whitfield, A. E.; Falk, B. W.; Rotenberg, D. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. **Virology**, v. 47, p. 278–289, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.026>

Wong, J. H.; Alfatah, M.; Sin, M. F.; Sim, H. M.; Verma, C. S.; Lane, D. P.; Arumugam, P. A yeast two-hybrid system for the screening and characterization of small-molecule inhibitors of protein-protein interactions identifies a novel putative Mdm2-binding site in p53. **BMC Biology**, v. 15, n. 108, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0446-7>

Xue, Q.; Wu, X. Q.; Zhang, W. J.; Deng, L. N.; Wu, M. M. Cathepsin L-like Cysteine Proteinase genes are associated with the development and pathogenicity of Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, p. 215, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20010215>

Yadati, T.; Houben, T.; Bitorina, A.; Shiri-Sverdlov, R. The Ins and Outs of cathepsins: physiological function and role in disease management. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1679, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3390/cells9071679>

Yang, C.-H.; Guo, J.-Y.; Chu, D.; Ding, T.-B.; Wei, K.-K.; Cheng, D.-F.; Wan, F.-H. Secretory laccase 1 in *Bemisia tabaci* MED is involved in whitefly-plant interaction. **Scientific Reports**, n. 7, p. 3623, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03765-y>

Yang, H., Zhang, R., Zhang, Y., Liu, Q., Li, Y., Gong, J., et al. Cathepsin-L is involved in degradation of fat body and programmed cell death in *Bombyx mori*. **Gene**, v. 760, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144998>

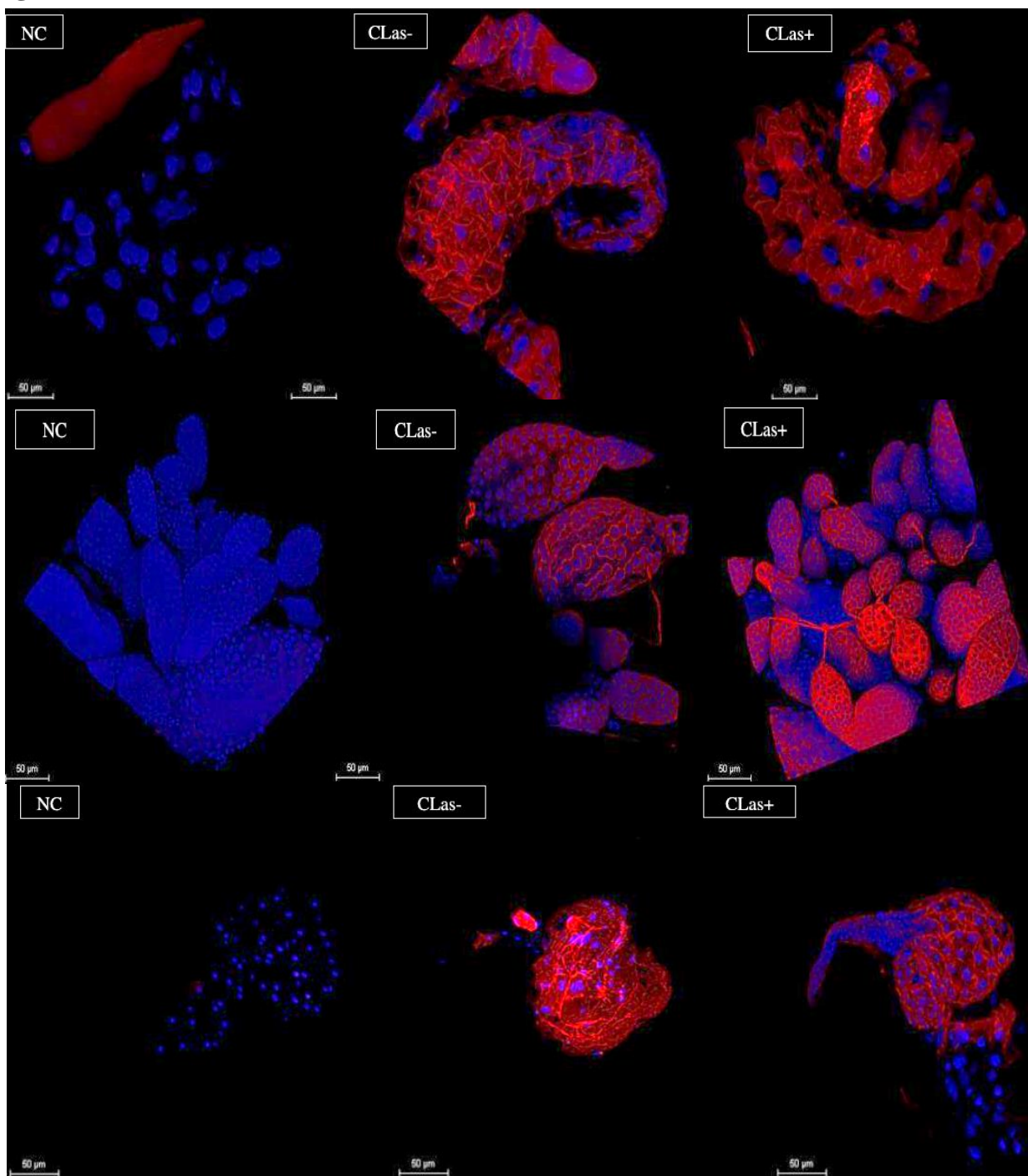
Yu, H. Z., Huang, Y. L., Li, N. Y., Xie, Y. X., Zhou, C. H., and Lu, Z. J. Potential roles of two Cathepsin genes, DcCath-L and DcCath-O in the innate immune response of *Diaphorina citri*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 22, p. 1060–1069, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.05.010>

Zhao, X. F., Wang, J. X., Xu, X. L., Schmid, R., and Wieczorek, H. Molecular cloning and characterization of the cathepsin B-like proteinase from the cotton bollworm, *Helicoverpa*

armigera. Insect Molecular Biology, v. 11, n. 6, p. 567–575, 2002. Doi:
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00366.x>

APÊNDICE I

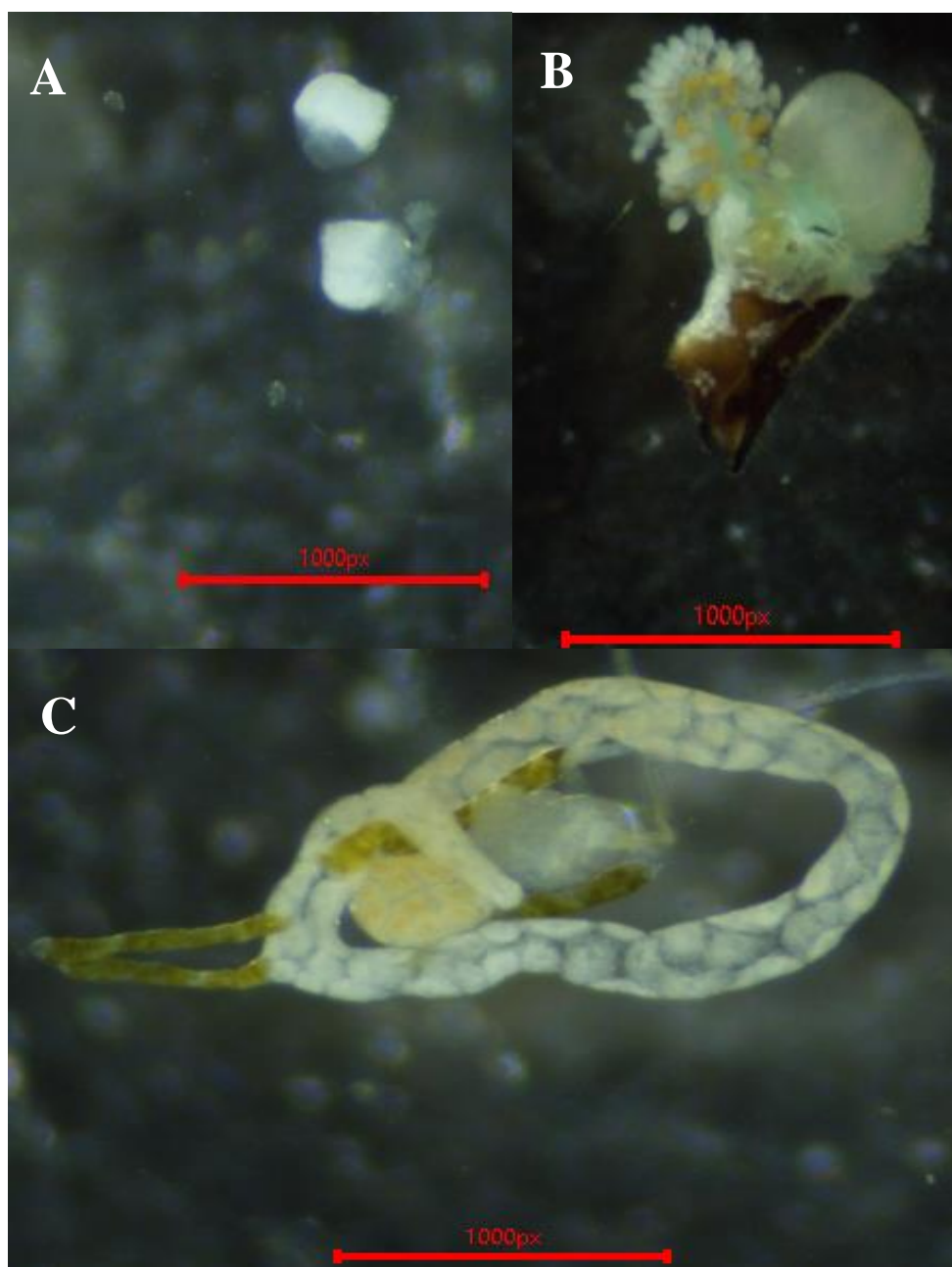
Figura 60 – Imagem de microscopia confocal tridimensional do intestino médio, ovário e glândula salivar de *D. citri*



A imagem tridimensional (3D) permite observar a morfologia natural dos órgãos dissecados, neste caso o formato tubular do intestino (1ª linha), os oócitos seguros por pedúnculos ao ovário (2ª linha), e a glândula salivar e o canal salivar (3ª linha). Os núcleos são visualizados em cor azul devido a marcação por DAPI. Em vermelho têm se a hibridização do anticorpo específico anti-DcCathL com o anticorpo conjugado ao Alexa-Flúor 568. A barra de escala representa 50 µm.

APÊNDICE II

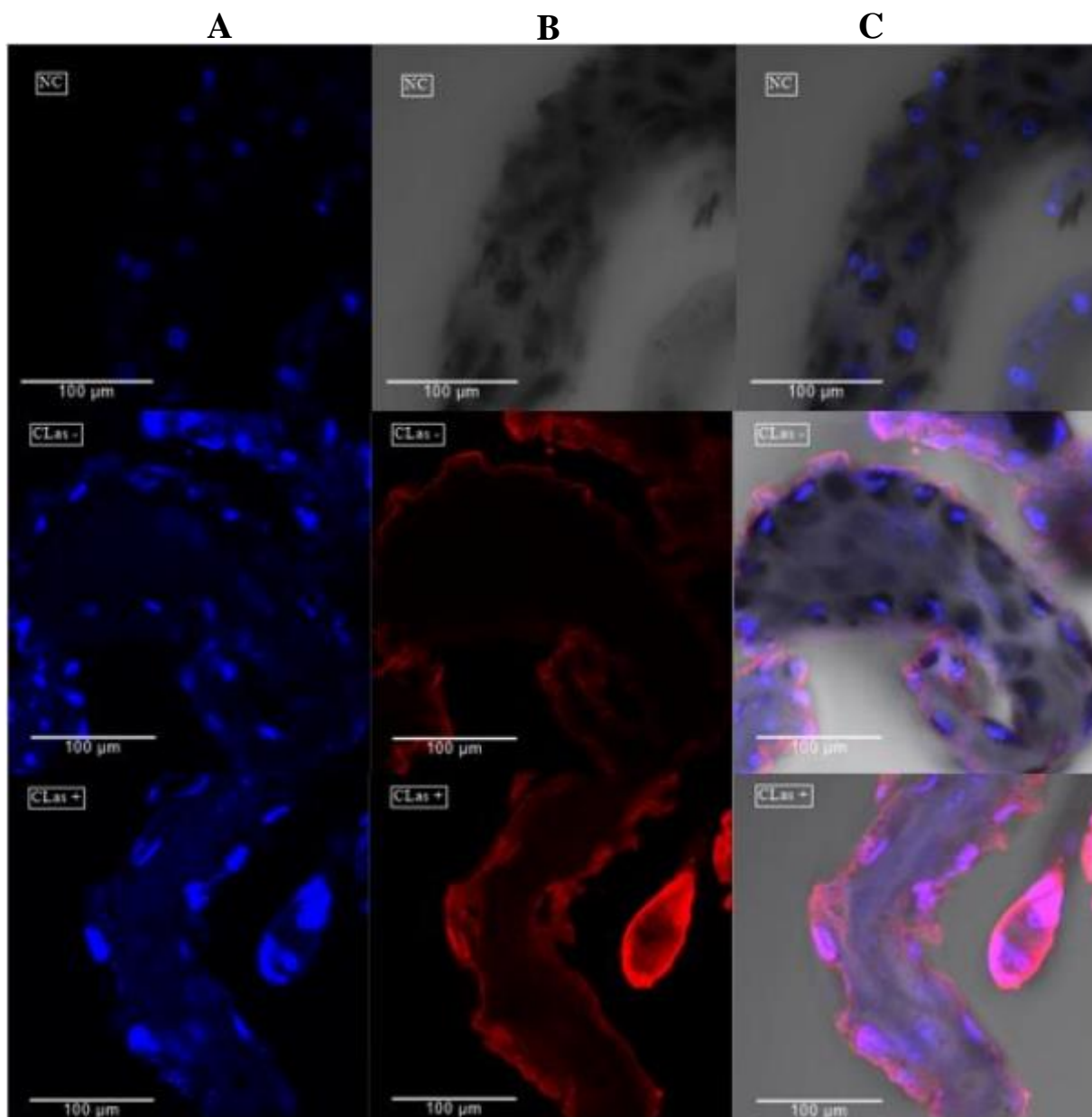
Figura 61 – Imagem do par de glândula salivar, ovário e intestino médio de *D. citri*. Visão ampliada em estereomicroscópio



Visualização das glândulas salivares (A), ovário (B) e intestino médio (C) de *D. citri*. As glândulas salivares possuem o formato característico arredondado, de extremidades não lisas. No ovário, tem-se oócitos em desenvolvimento (pequenas estruturas circulares brancas) e já maduros (estruturas pequenas circulares amarelas). A estrutura arredondada maior e esbranquiçada é a espermateca. Quanto ao intestino médio é possível ver as células que constituem o tecido intestinal (região em formato tubular branco). Pode-se ver os túbulos de Malpighi (4 apêndices amarelados). A estrutura oval no meio do intestino caracteriza a presença da câmara de filtração e o esôfago (estrutura linear contínua à câmara de filtração). A imagem mostra que após a dissecação as estruturas do tecido e das células (morfologia do órgão) foram preservadas. A barra de escala indica 1000 pixels.

APÊNDICE III

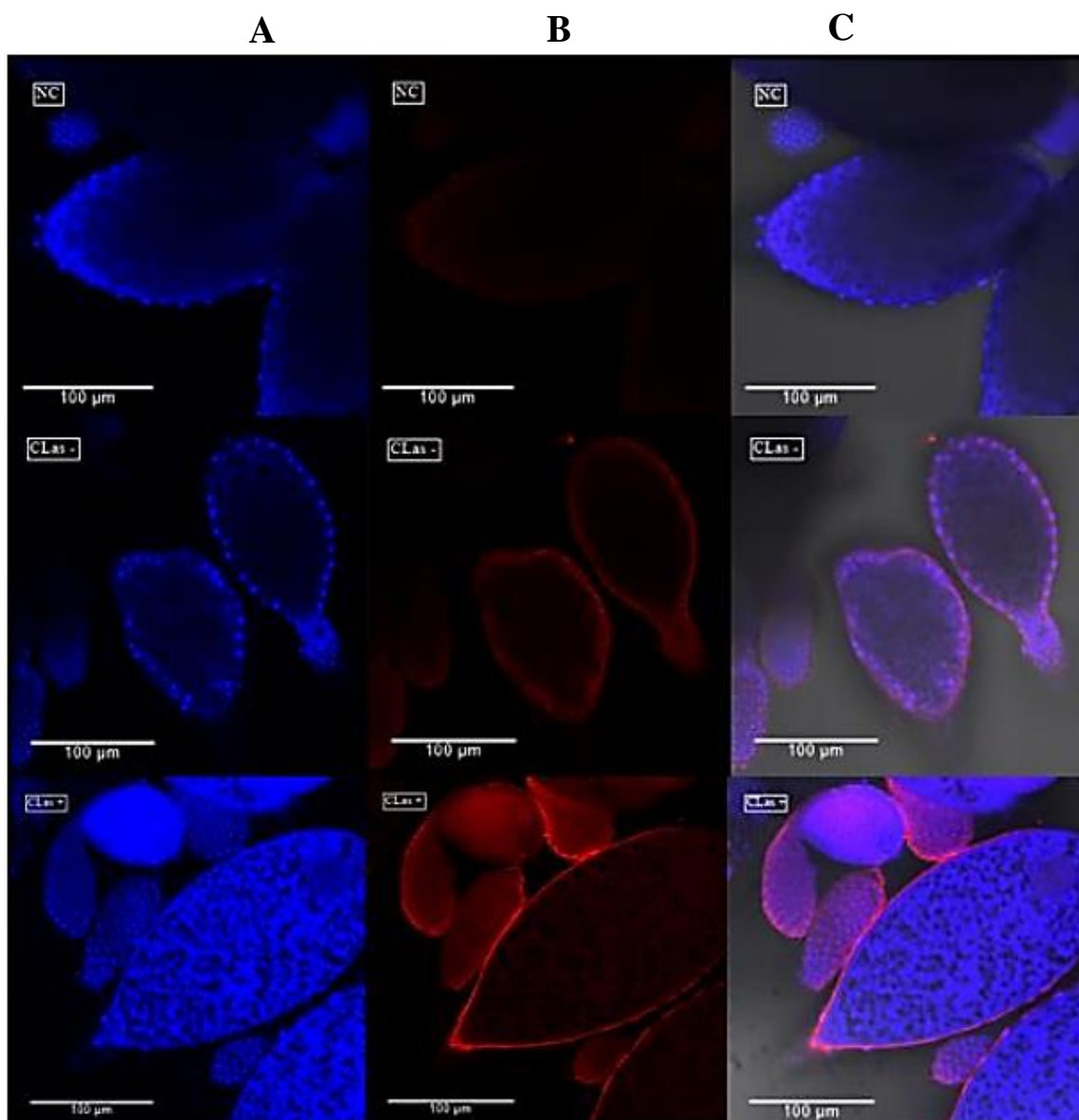
Figura 62 – Imagem de microscopia confocal para detecção de DcCathL no intestino médio de *D. citri*



Imunomarcção para detectar a proteína DcCathL em tecidos intestinais dissecados de *D. citri* saudável (CLas -) e infetado (CLas +). **A:** DAPI (azul) corando os núcleos das células intestinais; **B:** anticorpo DcCathL + Alexa flúor 568 (vermelho) marcando a proteína alvo nas células intestinais; **C:** imagem sobreposta. **NC:** controle negativo, na primeira linha. 2ª linha, detecção de DcCathL em intestino de insetos livres de bactéria e na última linha, infectados pela bactéria CLas. A barra de escala representa 100 µm. Observação em microscópio confocal com aumento de 40x. As setas em azul mostram a imunomarcção correspondente à DcCathL na porção periférica à membrana celular. Fonte: elaborado pela autora.

APÊNDICE IV

Figura 63 – Imagem de microscopia confocal para detecção de DcCathL no ovário de *D. citri*



Imunomarcção para detectar a proteína DcCathL em tecidos ovarianos dissecados de *D. citri* saudável (CLas -) e infectado (CLas +). **A:** DAPI (azul) corando os núcleos das células ovarianas; **B:** anticorpo DcCathL + Alexa flúor 568 (vermelho) marcando a proteína alvo nas células ovarianas; **C:** imagem sobreposta. **NC:** controle negativo, na primeira linha. 2ª linha, detecção de DcCathL em intestino de insetos livres de bactéria e na última linha, infectados pela bactéria CLas. A barra de escala representa 100 µm. Observação em microscópio confocal com aumento de 40x. As setas em azul mostram a imunomarcção correspondente à DcCathL na porção periférica à membrana celular. Fonte: elaborado pela autora.

APÊNDICE V

Figura 64 – Observação em estereomicroscópio da alimentação de ninfas de 4º ínstar de *D. citri* em dieta artificial com Kimwipes®



Ensaio de dieta artificial realizada para ninfas de *D. citri* utilizando Kimwipes® (Tavares e Bonning, 2022). Devido a presença dos corantes alimentícios verde e amarelo (McCormick®) na dieta, após a alimentação dos insetos a excreção da *honeydew* sofre alteração de cor. Assim, é possível ver uma coloração esverdeada (setas vermelhas) da *honeydew* secretada pelos insetos. A seta amarela indica *honeydew* resultante das primeiras horas de alimentação que se mantém, como na natureza, branca.

Anexo I

Figura 65 – Limites de probabilidade da predição da localização subcelular do DeepLoc 2.0.

Probability thresholds

Probability thresholds for the subcellular localizations. A localization is predicted if its probability is above the threshold shown below:

Localization	Cytoplasm	Nucleus	Extracellular	Cell membrane	Mitochondrion	Plastid	Endoplasmic reticulum	Lysosome/Vacuole	Golgi apparatus	Peroxisome
Threshold	0.4761	0.5014	0.6173	0.5646	0.6220	0.6395	0.6090	0.5848	0.6494	0.7364

Limites de probabilidade ou *probability thresholds* pré-estabelecidos pela ferramenta de análise *in silico* DeepLoc 2.0. A ferramenta pressupõe a possível localização proteica em dez regiões celulares, como citoplasma, núcleo, região extracelular, membrana celular, mitocôndria, plastídio, retículo endoplasmático, lisossomo/vacúolo, aparato de Golgi e peroxissomo. Para cada uma dessas localizações existe um limiar pré-definido e, quando as análises da sequência-alvo ultrapassam esses valores pré-definidos determinam a localização da proteína de interesse com base nesse programa. Disponível em: <https://services.healthtech.dtu.dk/cgi-bin/webface2.cgi?jobid=65DD5D250000F536CDDC6FD&wait=20>