



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE INIBIDORES DE PROTEASE SINTÉTICOS NA PRESENÇA DO ENDOSSIMBIONTE *Candidatus Carsonella ruddii* EM *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: PSYLLIDAE).

Joáz Dorneles Junior^{1,2}; Maisa Lopes Apolinário²; Samantha Zanotta³; Thiago Pap Dolcemascallo³; Lillian Silveira Pereira³; Fernando Javier Sanhueza Salas³; Jeanne Scardini Marinho Prado²; Simone de Souza Prado²

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu-SP. joaz.dorneles@gmail.com ²Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP. simone.prado@embrapa.br; maisal.a@hotmail.com; jeanne.marinho@embrapa.br ³Instituto Biológico, São Paulo-SP. samanzanotta@hotmail.com; thiago.pap@hotmail.com; lisilveirapereira@hotmail.com; salas@biologico.sp.gov.br;

RESUMO - Huanglonbing (HLB) ou Greening é atualmente a doença mais importante do citros, acarretando prejuízos econômicos significativos à cultura mundialmente. A doença é causada por bactérias do gênero *Candidatus Liberibacter* que bloqueiam o floema, iniciando assim o desenvolvimento da doença. A disseminação dessa bactéria ocorre através do inseto vetor *Diaphorina citri*, ou psilídeo-dos-citros. Estudos demonstram que alguns inibidores de protease têm ação no controle de insetos e podem ser influenciados pela presença de simbiossiontes, que ocorrem em seu aparelho digestivo. Neste sentido, o experimento consistiu em três tratamentos, nos quais mudas de *Murraya paniculata* foram submetidas a inibidores sintéticos de proteases (E-64 e Berenil) e uma solução testemunha. A aplicação das soluções foi realizada via drench, sendo que para cada tratamento foram realizadas cinco repetições, sendo analisado 1 indivíduo por repetição, perfazendo um total de 150 psilídeos. A detecção do endossimbionte ocorreu através de extração e amplificação de DNA com *primers* específicos. Os resultados obtidos revelaram que os insetos submetidos ao tratamento com o inibidor de protease Berenil apresentaram maior porcentual de detecção do endossimbionte primário, *Candidatus Carsonella ruddii* quando comparados aos insetos submetidos ao inibidor de protease E-64. Os dados fornecidos pelo presente experimento podem contribuir para a elaboração de novas estratégias de controle de HLB através de inibidores de protease e/ou manipulação de endossimbiossiontes.

Palavras-chave: HBL, transmissão, bactéria, simbiossionte.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o 2º produtor mundial de citros, sendo o principal produtor de laranjas, contribuindo com cerca de 30% da produção mundial de laranja, 50% da produção de suco e 85% do mercado mundial dessa commodity. A doença HLB causada por bactérias de floema, *Candidatus Liberobacter* spp., é a maior ameaça aos pomares do país, por afetar em alto grau todas as variedades, tornando os pomares inviáveis economicamente se medidas de controle não



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA **Instituto Agrônomo - Campinas, SP**

7 a 9 de Fevereiro de 2017

forem tomadas. O HLB encontra-se distribuída nos continentes Africano, Americano e Asiático. Considerando-se o impacto dos danos, os custos se ampliam pelas reduções da produtividade, necessidade de controle e longevidade dos pomares, podendo inviabilizar a atividade econômica sob níveis endêmicos da doença conforme pode ser consultado nos relatórios anuais da FUNDECITRUS (2007, 2012).

No curto prazo, a estratégia mais segura de controle de HLB combina o uso de mudas sadias, redução do inóculo (erradicação de plantas doentes) e redução da transmissão pelo vetor. Não existem métodos de controle curativos que possam ser usados em pomares comerciais. Atualmente, o custo de produção de um hectare de citros é de cerca de R\$ 10.000,00, sendo 5-15% do valor relacionado aos custos com manejo do vetor, o psílídeo-dos-citros, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Ao sugar a seiva da planta, o inseto adquire a bactéria do HLB, onde posteriormente, pelo mesmo modo, a inocula em outras plantas sadias ao se alimentar. Portanto existe grande dificuldade no estabelecimento do controle do vetor. O atual controle químico praticado para o psílídeo implica em pulverizações quinzenais e semanais, muitas vezes sem preconizar o Manejo Integrado de Pragas, elevando o risco potencial de acúmulo de resíduos de agrotóxicos acima de limites permitidos. As opções para o controle são através da eliminação do vetor, com o uso de controle biológico e inseticidas (FUNDECITRUS 2007, 2012).

Nos últimos anos, muitas são as pesquisas que ilustram a diversidade e a importância da interação inseto-microrganismos, no caso simbiotes. Os simbiotes podem ser encontrados associados aos insetos de modo obrigatório e também chamados de simbiotes primários, ou de modo facultativo e também chamados de simbiotes secundários. Essas interações com simbiotes podem resultar em relações benéficas, neutras ou prejudiciais ao hospedeiro (inseto) (MORAN, 2006). Portanto, a utilização de simbiotes no controle alternativo de *D. citri* é uma possibilidade, visto que populações do psílídeo comumente hospedam o simbiote primário *Candidatus Carsonella ruddii* e dois simbiotes secundários, *Arsenophonus* e uma β -proteobacteria, também conhecida como simbiote do sincício (SUBANDIYAH et al., 2000).

Inibidores de proteinase, são compostos orgânicos presente em plantas hospedeiras e que agem nas proteinases presentes no interior do intestino dos insetos e levam o inseto a morte por inanição. O uso desses inibidores isolados pode ser promissor na agricultura para o controle de insetos-pragas. Há relatos de que alguns simbiotes atuam na expressão de enzimas proteolíticas



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

e ajudam o hospedeiro a contornar a produção de inibidores produzidos de plantas. Contudo sua ação no simbionte primário de *D. citri* é inexistente.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da Embrapa - Meio Ambiente, em Jaguariúna/SP. Os tratamentos foram o inibidor sintético de proteases (E-64), o inibidor proteico (Berenil) e a testemunha (controle). Em cada planta foram colocados 10 insetos/repetição, sendo 5 repetições/tratamento. A aplicação dos inibidores nas mudas de murta (*Murraya paniculata*) seguiu o modelo descrito por Sanches et al. (2009). Um inseto/tratamento/repetição foi coletado, armazenado em tubo eppendorf e mantido à -20°C para posterior análises moleculares. O protocolo de extração de DNA utilizado foi modificado de Rogers and Bendich (1988). Para a detecção do simbionte primário foi utilizado o primer específico DC16SMycR (5'-CACCTGTCTCAAAGCTAAAG-3') com o primer universal 16SA2 (5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC-3') (SUBANDIYAH et al., 2000). Três amostras foram selecionadas e enviadas para sequenciamento no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico (São Paulo) para a confirmação de que as amostras amplificadas eram do simbionte *C. ruddii*,

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As três amostras enviadas para o sequenciamento quando realizado o BLAST no site do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), mostraram alta porcentagem de similaridade com a sequência parcial do gene ribossomal 16S de *Candidatus Carsonella ruddii* presente no banco de dados sob a identidade de EU914941.1 como pode ser visualizado na figura 1.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| <input type="checkbox"/> Candidatus_Carsonella_ruddii_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence | 950 | 950 | 97% | 0.0 | 99% | EU914941.1 |



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Figure 1: Similaridade e valores máximos de uma das sequencias enviadas para o sequenciamento com a sequencia mais próxima encontrada no banco de dados do NCBI.

Dos 50 insetos avaliados em cada tratamento, 90 e 93%, respectivamente para os insetos advindos do tratamento controle e aplicação do inibidor de protease Berenil apresentaram o simbionte *C. ruddii*, enquanto somente 50% dos insetos que se alimentaram nas plantas após a aplicação do inibidor de protease E-64 apresentaram o simbionte como pode ser observado na figura 2.

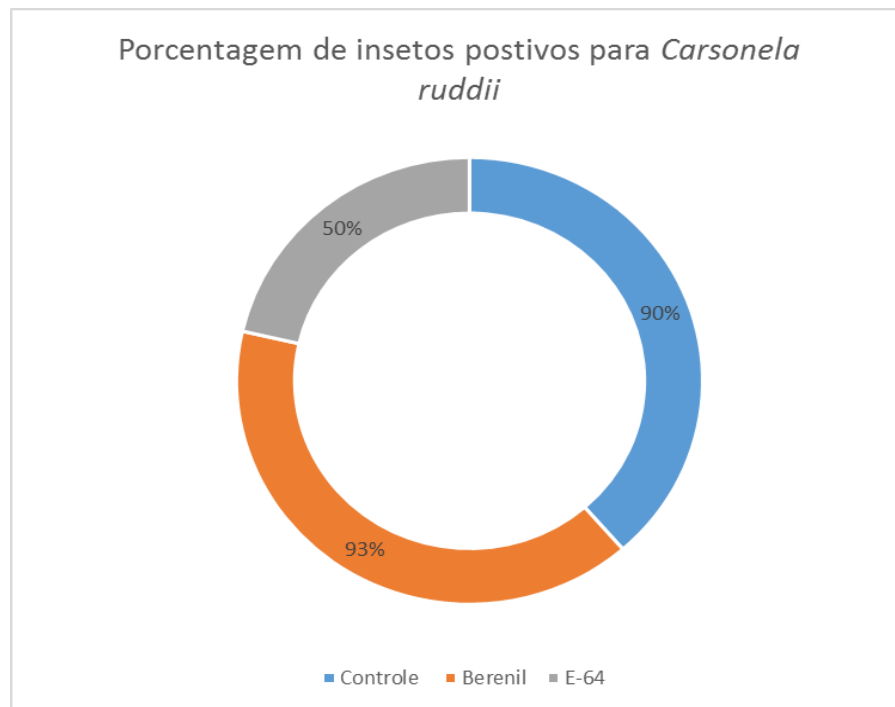


Figure 2: Porcentagem de insetos positivos para o simbionte *C. ruddii* após a aplicação do inibidor de protease Berenil (93%), controle (90%) e do inibidor de protease E-64 (50%).

Recentemente alguns autores relataram a existência de simbioses que influenciam na expressão de enzimas proteolíticas e ajudam seu hospedeiro a contornar a produção de inibidores de proteases produzidos de plantas e, portanto, ajudando o inseto a sobreviver (SEMENOVA et al., 2011; PILON et al., 2013).



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Neste trabalho foi demonstrado que os inibidores de proteinase podem influenciar na detecção e/ou na população dos endossimbiontes presentes no psílideo-do-citros. Entretanto, não sabemos se os inibidores de proteína simplesmente mataram os simbiosiontes, ou se os simbiosiontes ajudaram o inseto a sobreviver. Inúmeros são os questionamentos dessas interações inseto-microrganismos, mas os dados coletados neste estudo podem contribuir para a elaboração de novas estratégias de controle de HLB através de inibidores de protease e/ou manipulação de endossimbiontes.

CONCLUSÃO

O inibidor de protease Berenil afetou negativamente a detecção e/ou população do endossimbionte *C. ruddii* presente no psílideo-dos-citros, *D. citri*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FUNDECITRUS. Relatório Anual. 2007. <http://www.fundecitrus.com.br/pdf/relatorios/2007.pdf>

FUNDECITRUS. Relatório Anual. 2012. <http://www.fundecitrus.com.br/pdf/relatorios/2012.pdf>

MORAN, N.A. Symbiosis. *Current Biology* 16: R866-R871. 2006.

PILON, F.M.; VISOTTO, L.E.; GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA, M.G.A. Proteolytic activity of gut bacteria isolated from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*. *J. Comp. Physiol B* 183:735-747. 2013.

ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual A6*: 1-10. 1988.

SANCHES, A.L.; FELIPPE, M.R.; CARMO, A.U.; RUGNO, G.R.; YAMAMOTO, P.T. Eficiência de inseticidas sistêmicos, aplicados em mudas cítricas, em pré-plantio, no controle de *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae). *BioAssay* 4:6. 2009.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA
Instituto Agrônômico - Campinas, SP
7 a 9 de Fevereiro de 2017

SEMENOVA, T.A.; HUGHES, D.P.; BOOSMSMA, J.J.; SCHIOTT, M. Evolutionary patterns of proteinase activity in attine ant fungus gardens. *BMC Microbiology* 11:15. 2011.

SUBANDIYAH, S.; NIKOH, N.; TSUYUMU, S.; SOMOWIYARJO, S.; AND FUKATSU, T. Complex Endosymbiotic Microbiota of the Citrus Psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). *Zoological Science*, 17: 983-989. 2000.