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

Silenciamento de genes de *Diaphorina citri* Kuwayama por RNA de interferência

Jéssika Angelotti Mendonça

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba
2019**

Jéssika Angelotti Mendonça
Engenheira Agrônoma

Silenciamento de genes de *Diaphorina citri* Kuwayama por RNA de interferência
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2019

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

Mendonça, Jéssika Angelotti

Silenciamento de genes de *Diaphorina citri* Kuwayama por RNA de interferência / Jéssika Angelotti Mendonça. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

56 p.

Tese (doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Citrus* 2. HLB 3. Psilídeo-asiático-dos-citros 4. RNAi. I. Título

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, pelo dom da vida, pois sem Ele nada seria possível.

Ao meu esposo **Leandro**, companheiro de todas as horas, grande amigo que sempre me ouviu quando necessário, me apoiou, deu carinho e atenção, e sempre soube dizer as palavras que me acalmam nos momentos mais conturbados.

Aos meus pais, **Gilmar e Marcia** responsáveis pela minha formação pessoal, que nunca mediram esforços para me manter estudando, a minha querida irmã **Priscila**, pela consideração e apoio nos momentos mais importantes de minha vida.

Aos meus queridos amigos, pela amizade, companheirismo e apoio sempre que precisei. Em especial à Meire, Lígia, Girlaine e Marie e aos amigos do Lab. Alógamias (Júlia, Felipe, Filipe Couto, Ítalo, Giovani) pelo acolhimento e diversão.

Ao orientador deste trabalho Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, pela orientação e confiança depositada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

À Universidade de São Paulo, à ESALQ e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia pela oportunidade concedida.

Aos professores da Universidade de São Paulo que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação profissional e para a realização desse trabalho.

Ao professor Antônio Figueira pelo direcionamento nas análises moleculares e pela parceria nas análises de microscopia.

Ao Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, coordenado pelo professor Pedro Yamamoto, em especial ao Diosef por realizar a criação dos insetos.

Ao Laboratório de Anatomia, coordenado pela Professora Beatriz Apezatto.

Ao João Paulo pelo auxílio nas análises de microscopia.

Aos técnicos Liliane (Lili), Felipe, Marli e Eder pelo auxílio prestado.

A todos, aqui não citados, que direta ou indiretamente fizeram parte da realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“Sou das que pensam que a ciência tem uma grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é só um técnico: é também uma criança colocada diante de fenômenos naturais que lhe impressionam como um conto de fadas.”

Marie Curie

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. CITROS: ASPECTOS GERAIS	13
2.2. HUANGLONGBING	13
2.3. <i>DIAPHORINA CITRI</i> KUWAYAMA	15
2.4. RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi)	16
2.5. GENES CANDIDATOS AO SILENCIAMENTO	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. CRIAÇÃO DE INSETOS	23
3.2. EXPRESSÃO DOS GENES CANDIDATOS NOS DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS INSETOS	23
3.3. SÍNTESE DE dsRNA	26
3.4. BIOENSAIOS DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>DIAPHORINA CITRI</i> ALIMENTADA COM dsRNA PARA SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNA DE INTERFERÊNCIA	28
3.5. DETERMINAÇÃO DE SILENCIAMENTO GÊNICO NO PSILÍDEO <i>DIAPHORINA CITRI</i> ALIMENTADO COM dsRNA	29
3.6. QUANTIFICAÇÃO DA ALIMENTAÇÃO DE <i>D. CITRI</i> QUE INGERIRAM dsRNA PARA SILENCIAMENTO	30
3.7. TESTE DE DISTRIBUIÇÃO DE dsRNA PELA FOLHA E AQUISIÇÃO PELO INSETO.....	31
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. EXPRESSÃO DOS GENES CANDIDATOS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS INSETOS	33
4.2. SOBREVIVÊNCIA DE <i>D. CITRI</i> EM FUNÇÃO DA DOSE DE dsRNA	34
4.3. EXPRESSÃO DOS GENES ALVO DE PSILÍDEO <i>DIAPHORINA CITRI</i> ALIMENTADO COM dsRNA	36
4.4. EFEITO DE dsRNA PARA SILENCIAMENTO NA ALIMENTAÇÃO DE <i>D. CITRI</i>	38
4.5. DISTRIBUIÇÃO DE dsRNA PELA FOLHA E AQUISIÇÃO PELO INSETO	39
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS.....	51

RESUMO

Silenciamento de genes de *Diaphorina citri* Kuwayama por RNA de interferência

O aumento da incidência da doença huanglongbing (HLB) nos pomares brasileiros tem contribuído significativamente para o aumento do custo de produção de laranja no Brasil, devido à suscetibilidade de todas as variedades cultivadas. O HLB é associado às bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus* e *Candidatus Liberibacter americanus*, transmitidas pelos psílídeos *Diaphorina citri* e *Trioza erythrae*. No Brasil, o inseto vetor responsável pela rápida disseminação da doença é o psílídeo *Diaphorina citri*. Os principais métodos de controle do HLB são a eliminação de plantas sintomáticas, uso de mudas sadias e controle do vetor. O uso de plantas geneticamente modificadas pode ser uma alternativa ao uso excessivo de inseticidas para controle do inseto vetor. Sendo assim, pode-se adotar uma nova tecnologia que se baseia no uso de RNAs de interferência (RNAi) para o silenciamento de genes específicos do inseto vetor. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do silenciamento dos genes *calreticulina* (*DcCRT*), *lacase* (*DcLAC*) e *Snf7* (*DcSNF7*) de *Diaphorina citri* por RNA de interferência via alimentação em folhas destacadas de *Murraya paniculata* que absorveram solução contendo dsRNA de silenciamento. A princípio, foi avaliada a expressão dos genes candidatos em diferentes estádios fenológicos dos insetos. Em seguida, foram realizados bioensaios de sobrevivência e silenciamento, com as doses 0, 5, 25 e 50 µg de dsRNA. A sobrevivência dos insetos foi avaliada ao longo de 144 horas, enquanto que os insetos utilizados na análise de expressão gênica foram coletados 12, 24, 48, 72 e 96h após o início da alimentação. Para os genes *DcCRT*, relacionado à quelatização de íons cálcio, e *DcLAC*, relacionado à gelificação oxidativa do estilete, ambos envolvidos no processo alimentar do inseto, também foi observado o efeito das doses de dsRNA na quantidade de alimento ingerido, 120h após o início da alimentação. Além disso, também foi realizado bioensaio com dsRNA Cy3-labeled, para verificar a distribuição do dsRNA absorvido. A expressão dos genes candidatos, de modo geral, se manteve uniforme ao longo dos estádios de desenvolvimento dos insetos, exceto para o gene *DcLAC* que apresentou maior expressão em adultos recém emergidos do que nos demais estádios avaliados. Nos bioensaios com dsRNA de silenciamento, observou-se fenótipo letal apenas com o silenciamento do gene *DcSnf7*, 144 horas após o início da alimentação. Durante o período avaliado, foi constatada redução na expressão gênica apenas de *DcCRT*, após 12h de alimentação e *DcLAC* após 96h de alimentação com seus respectivos dsRNA de silenciamento. Além disso, a dose de 5 µg de dsRNA foi suficiente para causar tal efeito de silenciamento gênico. No bioensaio para quantificação da alimentação, observou-se redução na excreção de aminoácidos nos insetos alimentados com 5 µg de dsRNA, em ambos os genes candidatos (*DcCRT* e *DcLAC*) 120h após o início da alimentação. Adicionalmente, a análise de distribuição de dsRNA pela folha mostrou que há absorção do dsRNA pela folha destacada, permitindo a alimentação pelo inseto. Dessa forma, conclui-se que os genes estudados apresentam potencial para o controle do psílídeo *Diaphorina citri*, via silenciamento gênico por RNAi.

Palavras-chave: *Citrus*; HLB; Psilídeo-asiático-dos-citros; RNAi

ABSTRACT

Gene silencing of *Diaphorina citri* Kuwayama by RNA interference

The increase in the incidence of huanglongbing disease (HLB) in Brazilian orchards has contributed to increase of orange production costs in Brazil, due to the susceptibility of all cultivated variety of orange. HLB is associated with the *Candidatus* *Liberibacter asiaticus*, *Candidatus* *Liberibacter africanus* and *Candidatus* *Liberibacter americanus* bacteria, transmitted by the psyllids *Diaphorina citri* and *Trioza erytreae*. In Brazil, the insect vector responsible for the rapid spread of the disease is *Diaphorina citri*. The most important methods of HLB control are the elimination of symptomatic plants, the use of healthy nursery trees, and vector control. The use of genetically modified plants may be an alternative to the excessive use of insecticides to control the insect vector. Therefore, a new technology based on using RNAs of interference (RNAi), for silencing specific genes of the insect vector can be used. Thus, the aim of this work was to evaluate the effect of silencing *calreticulin* (*DcCRT*), *laccase* (*DcLAC*) and *Snf7* (*DcSNF7*) genes in *Diaphorina citri* by interference RNA through feeding in leaves of *Murraya paniculata* that absorbed a solution containing dsRNA of silencing. At first, the expression of the candidate genes in different phenological stages of the insects was evaluated. Survival and silencing bioassays were then performed at doses of 0, 5, 25 and 50 µg of dsRNA. Insect survival was evaluated over 144 hours, while the insects used in gene expression analysis were collected 12, 24, 48, 72 and 96 hours after feeding. For the *DcCRT* genes, associated to the calcium ion chelation, and *DcLAC*, related to the oxidative gelling of the stylet, both involved in the insect feed process, the effect of the doses of dsRNA on the amount of food ingested, 120h after the beginning of feeding was observed. In addition, a bioassay with Cy3-labeled dsRNA was also performed to verify the distribution of absorbed dsRNA. The expression of the candidate genes generally remained uniform throughout the stages of insect development, except for the *DcLAC* gene that showed greater expression in newly emerged adults than in the other evaluated stages. In the bioassays with dsRNA for gene silencing, a lethal phenotype was observed only with the silencing of the *DcSnf7* gene, 144 hours after the beginning of feeding. During the evaluated period, there was a reduction in the gene expression only of *DcCRT*, after 12h of feed and *DcLAC* after 96h of feeding with their respective silencing dsRNA. Additionally, the dose of 5µg of dsRNA was enough to cause this gene silencing effect. In the bioassay for feeding quantification, a reduction in amino acid excretion was observed in insects fed with 5 µg of dsRNA, in both candidate genes (*DcCRT* and *DcLAC*) 120 h after the beginning of feeding. In addition, the analysis of dsRNA distribution by the leaf showed that there is absorption of the dsRNA by the detached leaf, allowing feeding by the insect. Thus, we conclude that the genes studied have potential for the control of the psyllid *Diaphorina citri*, through gene silencing mediated by RNAi.

Keywords: *Citrus*; HLB; Asian citrus psyllid; RNAi

1. INTRODUÇÃO

O suco de laranja é uma das principais *commodities* agrícolas do Brasil. A produção nacional de laranja na safra 2018/19 foi de 285,98 milhões de caixas de 40,8 kg cada (FUNDECITRUS, 2019). O Brasil é o maior exportador mundial de suco de laranja congelado, com volume comercializado superior a 880 mil toneladas em 2016. Naquele mesmo ano, a área de laranja colhida no Brasil foi superior a 650 mil hectares, com produtividade média de aproximadamente 26 mil kg ha⁻¹ (FAO, 2018).

No entanto, apesar da significativa importância econômica nacional, o custo de produção de laranja no Brasil tem aumentado gradativamente nos anos recentes, devido ao aumento da incidência de *Huanglongbing* (HLB). Esse aumento tem ameaçado a estabilidade deste importante setor da economia agrícola brasileira, principalmente, devido à suscetibilidade de praticamente todas as espécies e variedades de cítricos cultivadas (FUNDECITRUS, 2018a). O HLB é associado a três espécies do gênero *Candidatus Liberibacter*: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) e *Candidatus Liberibacter africanus* (Laf), que apresentam colonização restrita ao floema das plantas e são transmitidas por um inseto vetor, o psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), o que acelera sua disseminação (DA GRACA et al. 2016).

No Brasil, estima-se que 18,15% das árvores, localizadas na maior região produtora do país, que corresponde a São Paulo, Triângulo e Sudoeste de Minas Gerais, estão contaminados com HLB, maior incidência registrada desde a identificação da doença em 2004 (FUNDECITRUS, 2018b). As principais formas de controle do HLB envolvem o controle preventivo da contaminação das plantas, pela eliminação de plantas sintomáticas, uso de mudas sadias e controle do vetor por inseticidas (BELASQUE JR. et al. 2010).

Uma nova forma de controle de pragas vem sendo desenvolvida, e pode ser utilizada para o controle do inseto vetor do HLB. Essa nova tecnologia baseia-se no uso de RNAs de interferência (RNAi) para o silenciamento de genes específicos do inseto vetor (BURAND, HUNTER 2013). Estudos têm demonstrado que a viabilidade da adoção desta técnica é dependente do sucesso da internalização de um RNA de dupla fita (dsRNA), molécula que irá provocar o silenciamento gênico (HUVENNE, SMAGGHE 2010). O fornecimento de dsRNA para insetos tem sido realizado por meio de injeção direta no corpo do inseto (WANG et al. 2018; EL-SHESHENY et al. 2016), ingestão pela alimentação em dietas artificiais (WANG et al. 2015; GALDEANO et al. 2017), aplicação tópica (YU, GOWDA, KILLINY 2017) ou plantas que expressem um *hairpin* de silenciamento gênico (BURAND, HUNTER 2013;

BHATIA, BHATTACHARYA 2018). Diversos estudos têm sido realizados para verificação do uso de RNAi para silenciamento gênico de inseto como em *Diabrotica virgifera* subsp. *virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) (BOLOGNESI et al. 2012; PINHEIRO et al. 2018, WU et al, 2018), *Mysus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) (PITINO et al. 2011; BHATIA et al. 2012), e *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) (THAKUR et al. 2014, EAKTEIMAN et al, 2018). Nestes estudos, os autores não apenas determinaram a eficiência do controle do inseto por meio da observação de baixas taxas de sobrevivência e efeitos metabólicos, como também observaram efeito do silenciamento gênico dos genes alvo nos insetos.

A utilização de plantas transgênicas com capacidade de produção de *hairpins* de um fragmento de gene a ser silenciado tem se mostrado como uma alternativa para o controle de *D. citri*, vetor do HLB. Contudo, a produção de plantas transgênicas é um processo oneroso e lento, principalmente, em se tratando de culturas perenes, como os citros. Diante desta perspectiva, a adoção de técnicas que permitam uma seleção prévia dos genes candidatos ao processo de transgenia é uma alternativa para agilizar o processo. Dessa forma, a avaliação de tais genes *in vitro* tem ganhado destaque. A realização destas avaliações, para determinar a eficiência dos genes de interesse e a posterior obtenção de organismos geneticamente modificados com tais genes, tem se mostrado como a alternativa promissora. Além disso, a utilização de variedades resistentes ao ataque desta praga tende a reduzir os danos ambientais, provocados pelo excesso de pulverizações de inseticidas. Os testes *in vitro* visando controle de *D. citri* via RNAi têm sido realizados por meio de aplicações tópicas de solução de dsRNA nos insetos (YU, GOWDA, KILLINY 2017; KILLINY et al. 2014, SANTO-ORTEGA, KILINY 2018), injeção no corpo do inseto (EL-SHESHENY et al. 2013) e via alimentação, sendo o dsRNA fornecido por meio de dieta artificial (GALDEANO et al. 2017) ou através de folhas destacadas (TANING et al. 2016).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o silenciamento dos genes *calreticulina*, *lacase* e *SNF7* de *D. citri* por RNA de interferência via alimentação em folhas destacadas de *Murraya paniculata* (L.) Jack que absorveram solução contendo dsRNA de silenciamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Citros: Aspectos Gerais

As plantas cítricas pertencem a família Rutaceae, que possui 1900 espécies distribuídas em 158 gêneros diferentes. Estas podem ser cultivadas em praticamente todas as áreas tropicais e subtropicais do planeta. As principais áreas comerciais encontram-se em regiões subtropicais entre as latitudes de 20°N e 20°S (PASSOS et al. 2013). O comércio de citros compreende o mercado internacional de frutas frescas e de suco concentrado. O sistema de consumo e produção de frutas cítricas e de suco concentrado envolve 130 países, sendo que as laranjas doces [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] contribuem com mais de 50% do volume total da produção (FAO, 2018). Considerando a produção total de cítricos, o Brasil é o segundo maior produtor mundial, com produção de mais de 19 milhões de toneladas em 2016, estando atrás apenas da China, com mais de 38 milhões de toneladas. Entretanto, considerando apenas a produção de laranja doce, o Brasil apresenta-se com maior destaque na produção mundial desta fruta, sendo também o maior produtor mundial e o maior exportador de suco concentrado (FAO, 2018).

Com a introdução do cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*), e mais recentemente do HLB (*Candidatus Liberibacter* sp.), o setor citrícola tem sofrido com redução de investimentos. Em São Paulo, o citrurão citrícola é composto por 5882 propriedades, número 22,5% menor do que em 2015 (FUNDECITRUS, 2018c). Consequentemente, o número de plantas de laranja doce do estado também vem diminuindo. Entre abril de 2015 e março de 2016, foram erradicados 21,3 mil hectares de laranja, e em contrapartida plantados apenas 9,5 mil hectares (FUNDECITRUS, 2016b).

2.2. Huanglongbing

Huanglongbing (HLB) significa "doença do ramo amarelo" e foi descrita pela primeira vez na China, em 1919. Atualmente, está presente em mais de 40 países, de todos os continentes (BOVÉ 2006). No Brasil, os primeiros relatos da incidência de HLB nos pomares surgiram em 2004, na cidade de Araraquara – São Paulo, localizada em uma das maiores regiões produtoras de cítricos do país (COLETTA FILHO et al. 2004). O agente associado ao HLB é uma bactéria Gram-negativa α -proteobactéria com capacidade de infecção de tecido floemático, cujo postulado de Koch ainda não foi finalizado, denominada de *Candidatus Liberibacter* spp. (WANG, TRIVEDI 2013; DA GRACA et al. 2016). No Brasil, são encontradas as espécies

Candidatus Liberibacter asiaticus e *Candidatus Liberibacter americanus* (BOVÉ 2006), sendo que a espécie *Candidatus Liberibacter asiaticus* se tornou a principal espécie presente em plantas sintomáticas de HLB, no estado de São Paulo (Brasil) (LOPES et al. 2009).

A contaminação das plantas com as bactérias associadas ao HLB tem causado grandes prejuízos à citricultura, uma vez que a doença afeta todas as variedades comerciais de laranja doce, tangerinas e toranjas, independentemente da idade e do porta-enxerto utilizado (Lopes et al. 2009). Plantas contaminadas com o patógeno apresentam menor tempo de vida, produtividade reduzida e baixa qualidade de frutos (WANG, TRIVEDI 2013). De modo geral, os sintomas de incidência de HLB nas folhas são identificados pela ocorrência de clorose difusa, caracterizada por manchas amareladas assimétricas em relação à nervura central, formando um "mosqueado", que pode ser confundido com deficiência nutricional de zinco, cálcio e nitrogênio (DA GRACA et al. 2016; COLETTA FILHO et al. 2004). Com o aumento da severidade da doença, os ramos se tornam atrofiados, e são levados à morte (WANG, TRIVEDI 2013). Nos frutos, os sintomas de incidência de HLB se manifestam pela ocorrência de frutos pequenos, assimétricos e sem sementes, com suco ácido e com baixos teores de sólidos solúveis e baixos valores de ratio (relação sólidos solúveis e acidez) (GOTTWALD 2010).

A produtividade em plantas contaminadas também é drasticamente afetada, podendo sofrer redução de 30 a 100% em comparação às plantas sadias em função da severidade da doença. A contaminação do pomar pode chegar a 95% de plantas contaminadas em um período de 3 a 13 anos após o aparecimento das primeiras plantas sintomáticas. A taxa de contaminação de plantas sadias em um pomar é dependente de alguns fatores, tais como da distância destas com as fontes de inóculo (plantas infectadas, seja em área comercial ou urbana), da população de insetos vetores (*D. citri*), e da idade das plantas no pomar no momento das primeiras infecções (GOTTWALD 2010). No estado de São Paulo, a incidência de plantas sintomáticas no pomar pode atingir 50% em três ou doze anos, em função da distância de pomares infectados e da adoção ou não de medidas de controle (BASSANEZI et al. 2010).

A rápida disseminação de *Candidatus Liberibacter* spp. se deve a ação de insetos vetores, que se alimentam em plantas contaminadas, contraem as bactérias, que permanecem em seu organismo e, ao se alimentarem em plantas sadias, transmitem as bactérias causadoras do HLB. Duas espécies foram descritas como insetos vetores das bactérias associadas ao HLB, o psílídeo-asiático-dos-citros (*D. citri*), e o psílídeo-africano-do-citros [*Trioza erythrae* del Guercio (Hemiptera: Triozidae)] (DA GRACA et al. 2016; ROBERTS et al. 2015). No Brasil, o psílídeo-asiático-dos-citros é o responsável pela transmissão desta doença.

2.3. *Diaphoria citri* Kuwayama

O psílídeo-asiático-dos-citros, *D. citri*, é originário do continente asiático e apresenta ampla distribuição geográfica (PARRA et al. 2010). Na citricultura, o controle deste inseto-praga se tornou essencial, desde 2004, devido à transmissão da bactéria *Candidatus Liberibacter* spp., patógeno associado ao HLB (COLETTA FILHO et al. 2004; TEIXEIRA et al. 2008).

O desenvolvimento do psílídeo-asiático-dos-citros ocorre em folhas jovens de plantas da família Rutaceae e de *M. paniculata*, conhecida no Brasil como murta de cheiro (PARRA et al. 2010). Estes insetos apresentam coloração marrom clara quando jovens e tornam-se escuros com o passar do tempo. Os adultos possuem cerca de 2,8 a 3,2 mm de comprimento e podem apresentar diferentes colorações abdominais, sendo cinza/marrom, azul/verde e amarelo/laranja (HALL et al. 2013). Ao se alimentarem, os insetos permanecem aderidos às folhas das plantas e liberam substâncias semelhantes ao "honeydew", que permitem o crescimento da fumagina (PARRA et al. 2010). As fêmeas adultas têm capacidade de ovipositar de 500 a 800 ovos, de coloração amarelada, em um período de dois meses, podendo chegar até 1900 ovos, em condições favoráveis e com folhas jovens de plantas hospedeiras disponíveis (PARRA et al. 2010; HALL et al. 2013).

Estudos indicam que a temperatura ideal de desenvolvimento de *D. citri* é de 20 a 25°C, sendo que em temperaturas abaixo de 6° e acima de 45°C não há o desenvolvimento do inseto (EL-SHESHENY et al. 2016). O período de incubação dos ovos varia de 3 a 9,5 dias a 28°C e 15°C, respectivamente. Além disso, houve maior sobrevivência de insetos cuja temperatura de incubação permaneceu em 28°C. Para o completo desenvolvimento das ninfas, é necessário 10,6 dias e 39,6 dias a 28 e 15°C, respectivamente. Dessa forma, a duração total do ciclo biológico foi de 14,4 a 49,3 nas temperaturas de 28 e 15°C, respectivamente. Além disso, a 28°C observaram-se maiores taxas de oviposição das fêmeas (748 ovos) e maior viabilidade dos mesmos (96,2%) (LIU, TSAI 2000), sendo limitantes para a oviposição temperaturas inferiores a 16°C e superiores a 41,6°C (HALL et al. 2011). Adicionalmente, a vulnerabilidade do inseto, ou seja, a mortalidade em decorrência de causas adversas varia de acordo com a fase de desenvolvimento, sendo os insetos em fase de ovos e ninfas os mais vulneráveis (HALL, HENTZ 2014).

A transmissão das bactérias associadas ao HLB pelo inseto vetor ocorre de forma persistente propagativa (GHANIM, et al. 2017). Estudos detectaram bactérias *Candidatus Liberibacter* spp. nas glândulas salivares, no canal alimentar, no trato digestório e na hemolinfa, sendo capaz de se espalhar por todo o corpo do inseto *D. citri* (AMMAR, SHATTERS, HALL

2011; GHANIM et al. 2017). Portanto, pode-se considerar que a transmissão de *Candidatus Liberibacter* spp. ocorra seguindo em três etapas. Primeiro ocorre a aquisição do patógeno pela alimentação do inseto vetor, seguida de um período de latência, no qual as bactérias adquiridas se multiplicam e se dispersam no corpo do inseto até atingir as glândulas salivares, e, portanto, estão disponíveis para inoculação (GRAFTON-CARDWELL et al. 2013).

A transmissão das bactérias associadas ao HLB é realizada apenas por insetos que já atingiram o quarto ou o quinto instar, não sendo relatada transmissão por insetos mais jovens. As ninfas são responsáveis pela maior taxa de transmissão do patógeno e, uma vez que estas adquirem o patógeno, podem transmiti-lo como ninfas e também quando se tornarem adultos (HALL et al. 2013). Além disso, estudos mostram que fêmeas infectadas com *Candidatus Liberibacter* spp. podem transmitir a bactéria às progênes, mesmo que em baixas taxas. Também pode haver transmissão de *Candidatus Liberibacter* spp. dos machos infectados para fêmeas não infectadas durante a cópula (MANN et al. 2011).

A rápida disseminação da *Candidatus Liberibacter* spp. por psílídeos se deve a preferência de alimentação dos mesmos. Insetos não infectados são atraídos mais fortemente por plantas infectadas, e uma vez que adquiriram o patógeno passam a apresentar preferência de alimentação em plantas não infectadas (WU et al. 2015). A contaminação de psílídeos com as bactérias associadas ao HLB no estado de São Paulo é de 65%, sendo que em regiões cujo controle deste inseto não é realizado de forma eficiente, o índice de contaminação dos insetos com as bactérias podem chegar à 74% (FUNDECITRUS, 2016a). Este dado é preocupante, uma vez que contaminados, estes insetos têm elevada capacidade de disseminação da doença. Portanto, o controle do inseto vetor se torna essencial para a redução do número de plantas infectadas no pomar. No entanto, devido ao elevado número de aplicações de inseticidas para controle do vetor, tem sido relatada a seleção de populações de insetos resistentes aos principais princípios ativos utilizados (TIWARI et al. 2011). Dessa forma, alternativas mais viáveis economicamente e ambientalmente vem sendo estudadas.

2.4. RNA de interferência (RNAi)

O RNAi é definido como um tipo de RNA capaz de inibir a tradução do RNA mensageiro (mRNA) transcrito, inibindo assim a síntese de proteínas específicas (SAURABH et al. 2014). O fenômeno de RNAi foi elucidado por Fire et al. (1998) em experimentos realizados com *Caenorhabditis elegans* (Rhabditida: Rhabditidae), nos quais comprovou-se a ação de RNAs de dupla fita no silenciamento gênico pós-transcricional. Os RNAs dupla fita (dsRNA) são essenciais para que haja o silenciamento gênico pós-transcricional. Estes são

moléculas de RNA que possuem sequências de nucleotídeos direta (sense) e reversa (antisense), separadas por um íntron, o que confere ao dsRNA estrutura *hairpin*, semelhante a um grampo (FIRE et al. 1998). Ao ser inserido na célula, o dsRNA é processado por meio de clivagem em pequenos RNAs de interferência (20-23 pb), realizado pela endonuclease RNase III, chamada DICER. Os pequenos RNAs de interferência são ligados ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) por meio da ligação de uma das fitas de RNA (ssRNA), denominada de fita guia, à proteína Argonauta (AGO), componente catalítico do RISC e a outras proteínas completando o complexo responsável pelo silenciamento do RNA mensageiro (mRNA) (SAURABH et al. 2014).

Nas células podem existir dois tipos de pequenos RNAs, os Micro RNAs (miRNA) e os siRNA (*small interference RNA*). Os miRNA são codificados por genes presentes no próprio organismo, conhecidos como genes *MIR* (PANDEY et al. 2015). Estes possuem segmentos complementares dentro da própria molécula, o que permite o dobramento da fita simples formando os pré-miRNAs. Os pré-miRNAs são processados pela DICER, e passam a ser compostos por 21 a 22 nucleotídeos que são ligados ao complexo RISC, levando à clivagem do mRNA alvo (ANGAJI et al. 2010; BURAND, HUNTER 2013). Por outro lado, os siRNA podem ou não ser codificados pelo genoma do organismo, podendo ser produzidos a partir de qualquer fita dupla de RNA no citosol, inativando o mRNA celular via clivagem (BURAND, HUNTER 2013). Os siRNA atuam no silenciamento gênico pós-transcricional dos mRNAs ou pela metilação de DNA e histonas, atuando também no silenciamento gênico transcricional (CZECH, HANNON 2011). A utilização experimental de RNAi explora a cadeia de siRNA.

O uso de RNAi para o controle de pragas tem se mostrado promissor. No entanto, para que sua ação seja eficiente, o inseto deve internalizar o dsRNA, que precisa ser absorvido pelo lúmen intestinal, para que este possa apresentar efeito na expressão dos genes desejados (HUVENNE; SMAGGHE 2010). A adequada aquisição do dsRNA é um dos pontos determinantes para que ocorra o silenciamento gênico por RNAi. Em estudos experimentais, geralmente a inserção dos dsRNA no metabolismo do inseto é realizada por meio de injeção direta de dsRNA no corpo do inseto ou através da alimentação em dietas contendo o dsRNA, seja em meio artificial ou em plantas transgênicas expressando o dsRNA (BURAND, HUNTER 2013).

Além do adequado fornecimento das construções de dsRNA, outros fatores interferem no silenciamento gênico por RNAi. Huvenne; Smagghe, (2010) descrevem cinco fatores de interferência: 1. a concentração de dsRNA, buscando-se uma concentração ótima; 2. a sequência de nucleotídeos do gene alvo, que pode ser variável entre os organismos; 3. O

comprimento do fragmento de dsRNA, o que determina a eficiência de aquisição pelo inseto; 4. A persistência do efeito do silenciamento gênico promovida pelo dsRNA; e 5. O estágio de desenvolvimento do inseto, uma vez que insetos mais jovens tendem a ter maior silenciamento do que adultos, sob as mesmas condições. Adicionalmente, para que o sistema de silenciamento gênico por RNAi seja eficiente, é necessário que o organismo alvo apresente a maquinaria celular de metabolização de dsRNA. Taning et al. (2016), por meio de análise *in silico* via ferramentas de bioinformática comprovaram a presença da sequência que codifica todas as enzimas chave no sistema de silenciamento em *D. citri*.

De forma pioneira, Mao et al. (2007) promoveram o controle da lagarta *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) em algodão, por meio do silenciamento do gene *glutathione-S-transferase (GST1)*, responsável pela sobrevivência das larvas deste inseto na presença de gossipol. Em seguida, a tecnologia de silenciamento gênico para controle de pragas passou a ser utilizada para o controle de diferentes insetos. Pitino et al. (2011), em um dos primeiros estudos com insetos sugadores, demonstraram o silenciamento de genes que apresentam alta expressão nas glândulas salivares (*MpC002*) e no intestino (*Receptor of Activated Kinase C - Rack-1*) do pulgão *Myzus persicae*, levando ao aumento da mortalidade dos insetos para o silenciamento do gene *MpC002*, e redução do número de ninfas na população para o silenciamento do gene *Rack-1*.

O silenciamento gênico por meio de RNAi visando o controle de *D. citri* foi primeiramente avaliado visando o silenciamento do gene *awd* associado ao desenvolvimento da asa, por meio de aplicação de tópica de dsRNA em ninfas de 5º instar, o que provocou aumento significativo na morte de ninfas e a geração de adultos com asas deformadas (El-Shesheny et al. 2013). A partir de então, o silenciamento de diversos genes alvo, por meio de aplicação tópica de dsRNA, tem sido avaliado em *D. citri*. Yu, Gowda e Killiny (2017) mostraram que o silenciamento do gene *muscle protein 20 (DcMP20)* aumentou a mortalidade de ninfas de 3º e 4º instares. Santo-Ortega e Kiliny (2018) silenciaram o gene *sucrose hydrolase (DcSuh)*, em ninfas de 5º instar, causando, não somente redução de sobrevivência dos insetos juvenis, mas também a redução do ciclo de vida dos insetos adultos.

Adicionalmente, outros estudos têm mostrado a eficiência da técnica para o controle de *D. citri*, por meio de outros métodos de entrega do dsRNA. Galdeano et al. (2017) obtiveram êxito no silenciamento dos genes *cathepsin D*, *chitin synthase* e *inhibitor of apoptosis* em insetos adultos e ninfas via alimentação. Taning et al. (2016) observaram mortalidade de insetos com o silenciamento do gene *arginine kinase*, relacionado à mobilização de energia e do gene

superoxide dismutase, relacionado ao sistema de antioxidante, em insetos alimentados em brotações de citros previamente tratadas com dsRNA.

2.5. Genes candidatos ao silenciamento

Os genes candidatos ao silenciamento neste trabalho foram selecionados, em trabalhos preliminares, pelo grupo de Pesquisa em Fruticultura Tropical e Subtropical da ESALQ. A seleção de tais genes foi realizada a partir da observação de sua função biológica, assim como, pelo efeito que seu silenciamento poderia provocar nos insetos em estudo. Além disso, foram observados estudos de silenciamento destes genes em outros insetos, os quais apresentaram resultados satisfatórios. Estes estão descritos nos tópicos a seguir.

2.5.1. Calreticulina (Crt)

Calreticulina (*Crt*) é uma proteína capaz de se ligar ao Ca^{2+} , tendo função essencial na alimentação de insetos sugadores. A penetração do estilete nos elementos crivados do floema ativa o sistema de defesa da planta por meio da ativação de canais de Ca^{2+} sensíveis a danos mecânicos, presentes na membrana plasmática. A ativação desses canais altera a concentração de Ca^{2+} no lúmen dos elementos crivados, por meio do influxo de Ca^{2+} do apoplasto e do retículo endoplasmático (WILL, VAN BEL. 2013). O influxo de Ca^{2+} ativa enzimas chave do sistema de defesa da planta que consiste, majoritariamente, na deposição do polímero β -1,3-glucano, sintetizado pela célula vegetal na presença de Ca^{2+} e da enzima calose sintetase, levando a obstrução dos elementos crivados (GUIGUET et al. 2016; WILL, VAN BEL, 2013). Contudo, a co-evolução dos insetos sugadores e do sistema de defesa das plantas permitiu a estes desenvolver estratégias para superar tal obstrução e manter sua alimentação. Dessa forma, ao inserir o estilete na célula vegetal, antes de iniciar a alimentação, os insetos sugadores excretam uma saliva aquosa na célula, composta por proteínas que se ligam a moléculas de Ca^{2+} , que impedem o aumento da concentração de Ca^{2+} no lúmen dos elementos crivados, evitando a obstrução dos vasos e permitindo sua alimentação (SHARMA et al. 2014; WILL, VAN BEL 2013). A calreticulina é uma dessas proteínas, pertencentes a família de proteínas quelantes de Ca^{2+} (CAROLAN et al. 2011).

A proteína Crt identificada em *D. citri* possui dois domínios conservados, o *Calreticulin/calnexin P domain* e o *Concanavalin A-like lectin/glucanase domain* (ConA)

característicos de proteínas chaperonas que atuam por meio de ligação com moléculas de Ca, retendo glicoproteínas não dobradas no retículo endoplasmático (BERGERON et al., 1994; WATANABE et al., 1994). A DcCrt também possui uma sequência característica de proteínas de retículo endoplasmático (*KDEL*), caracterizada pela sequência de aminoácidos Lys-Asp-Glu-Leu na região C-terminal (PELHAM, 1990).

O silenciamento gênico de *Crt* foi realizado por Jaubert-Possamai et al. (2007), via injeção de dsRNA *Ap-Crt* no corpo do pulgão-da-ervilha, *Acyrtosiphon pisum* Harris (Hemiptera: Aphididae). Neste caso, os autores observaram redução de 40% da expressão relativa do gene 5 dias após a injeção. Apesar de constatarem o silenciamento por meio da expressão gênica, não foi possível observar variações fenotípicas nos insetos que receberam o dsRNA de *Ap-Crt*. Além desse estudo, Liu et al. (2010) observaram a redução de 40% da expressão do gene *Crt* em *Nilaparvata lugens* Stal (Hemiptera: Delphacidae), 5 dias após a injeção intro-torácica de dsRNA de silenciamento.

2.5.2. Lacase (Lac)

A lacase é uma fenol-oxidase pertencente a superfamília de proteínas oxidase com múltiplos átomos de cobre (MCO). Esta proteína pode atuar sobre diversos substratos, incluindo difenóis, monofenóis, diaminas e lignina (YE et al. 2015). A proteína lacase tem sido encontrada na cutícula de várias espécies de insetos. Adicionalmente, foram encontradas duas formas principais de lacase, a lacase-1 e a lacase-2. A lacase-2 está envolvida na coloração da cutícula do besouro *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) (ARAKANE et al. 2005). Por outro lado, a proteína lacase-1 (Lac) foi encontrada no intestino, tubos de Malpighi e epiderme de *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae) (Dittmer et al. 2004).

Além disso, a proteína lacase-1 foi encontrada em glândulas salivares da cigarrinha *Nephotettix cincticeps* Uhler (Hemiptera: Cicadellidae), nas quais têm sua atividade constante durante todas as fases de desenvolvimento do inseto (HATTORI et al. 2005). Durante a alimentação, a lacase salivar, possivelmente, também atua como um reforço na gelificação oxidativa que ocorre na bainha do estilete através de uma reação de *quinone-tanning* (SOGAWA 1968). A avaliação de hibridação *in situ* revelou que o gene *Lac* é altamente expresso nas células V das glândulas salivares, sugerindo que a expressão de *Lac*, transcrição e subsequente produção e armazenamento da lacase ocorre nas células V (HATTORI et al. 2005). Logo, é sugerido que o gene *Lac* é especificamente expresso em glândulas salivares que

produzem lacase solúvel em uma forma ativa, e que esta proteína provoca rápida oxidação de substâncias fenólicas apenas depois de ser liberada na saliva.

Em estudo buscando o silenciamento do gene *Lac* no pulgão-da-espiga, *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae), para elucidar a importância da detoxificação realizada pela proteína laccase, Zhang et al. (2018) determinaram que a expressão do gene *SaLac* é maior nos estágios finais de desenvolvimento do inseto. Além disso, esse gene possui maior expressão nas glândulas salivares e trato digestório de pulgões ápteros do que alados. Portanto, a alimentação de insetos em plantas de trigo consideradas resistentes, por apresentarem elevado teor de compostos fenólicos, mostrou que a proteína Lac está diretamente envolvida no processo de detoxificação, e, conseqüentemente, é essencial para adaptação dos insetos à novas variedades de trigo consideradas resistentes ao ataque desta praga (ZHANG et al. 2018). Devido à elevada importância no processo alimentar, por conta da detoxificação do inseto, o gene *LAC* foi escolhido para ser silenciado em *D. citri*, via RNAi.

2.5.3. Snf7

A proteína Snf7 é uma das subunidades do complexo ESCRT-III (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III*), que está envolvido no transporte de proteínas para degradação pela via endossomal-autofágica de vários organismos (RAMASESHADRI et al. 2013). O direcionamento para degradação de proteínas indesejadas na célula ocorre por meio da sinalização, ou seja, ubiquitinação, das mesmas. Uma vez sinalizadas, as proteínas seguem para degradação nos lisossomos, em células animais, e no vacúolo, em células vegetais. As proteínas ubiquitinadas são direcionadas ao complexo ESCRT-III, do qual a Snf7 faz parte, que identifica tais proteínas, realizam a des-ubiquitinação e as direciona para degradação por meio de corpos multivesiculares formados no endossomo. Dessa forma, a proteína Snf7 está diretamente relacionada com a rota de degradação de proteínas nas células (RUSTEN, STENMARK 2009; HENNE et al. 2011).

O silenciamento gênico de *Snf7* por meio de RNAi foi estudado em *Diabrotica virgifera* subsp. *virgifera*, suprimindo significativamente a transcrição de mRNA de *DvSnf7* no intestino do inseto e reduzindo o nível de proteína Snf7, interrompendo uma função celular vital. Buscando identificar detalhadamente o mecanismo que levou a morte de larvas de *Diabrotica virgifera* subsp. *virgifera* alimentadas com ds-*DvSnf7*, Koci et al. (2014) analisaram alterações ultraestruturais nos enterócitos do intestino médio dessa larvas. Dessa forma, demonstraram que as fases progressivas dos sintomas patológicos causados por *DvSnf7-RNAi* em enterócitos

incluem o aparecimento de complexos macro-autofágicos com formas irregulares que, provavelmente, é a consequência da fusão defeituosa entre os corpos multi-lamelares e lisossomos; a descamação celular e perda de microvilosidade apical; a perda massiva de conteúdo celular, indicando perda da integridade da membrana e; a perda de pontos de junções entre as células, indicando uma deficiência no processo de des-ubiquitinação de proteínas de sinalização da membrana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Criação de insetos

Os insetos utilizados nos experimentos foram obtidos de criação do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ, mantidas de acordo com a metodologia adaptada de Parra et al. (2016). Para tal, os insetos foram mantidos em plantas de murta-de-cheiro (*M. paniculata*) acondicionadas em gaiolas de tecido do tipo *voil* (35 cm de comprimento x 35 cm de largura x 53cm de altura), em sala climatizada com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro.

3.2. Expressão dos genes candidatos nos diferentes estádios de desenvolvimento dos insetos

Para quantificação da expressão dos genes candidatos por RT-qPCR foram coletadas três réplicas biológicas de: 150 ninfas de 1° e 2° ínstaes (N12), 30 ninfas de 3° instar (N3), 10 ninfas de 4° e 5° ínstaes (N45), 5 adultos recém emergidos, coletados 24h após emergência (A1D), e 5 adultos 10 dias após a emergência, não sexados (A10D).

Os insetos coletados foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido e mantidos em congelamento a -80°C , para preservação do RNA. O RNA total foi extraído com TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. A quantidade e a pureza do RNA foram determinadas em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA) e sua integridade em gel de agarose (1%). O DNA genômico foi removido das amostras por meio do tratamento com DNase I Amplification Grade (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). O cDNA foi sintetizado a partir de 500 ng de RNA livre de DNA, com a enzima M-MLV RT (Fermentas, Waltham, MA), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a síntese, o cDNA foi diluído para a proporção 1:5 e armazenado a -20°C , para conservação.

A análise da expressão dos genes candidatos foi realizada com o reagente GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, EUA) em um equipamento Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, EUA), com o seguinte ciclo de amplificação: 1 ciclo de desnaturação a 95°C por 20 segundos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 3 segundos e anelamento e extensão a 60°C por 30 segundos. O volume de reação utilizado

foi de 10 µl, contendo 6 µl de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, EUA), 0,15 µl de cada primer (Forward e Reverse), 2,7 µl de água livre de RNase e 1 µl de cDNA.

A concentração adequada de cDNA foi determinada através de uma curva padrão baseada em uma diluição seriada. Os genes de referência *RPL7* e *GAPDH* foram selecionados de acordo com Bassan et al. (2017) (Tabela 1). A expressão dos genes candidatos nos estádios de desenvolvimento de *D. citri* foi calculada de acordo com a fórmula descrita por Pfaffl (2001). O estágio N12 foi utilizado como controle no cálculo da expressão.

Tabela 1. Primers para análise de expressão gênica

Gene	Sequência 5' – 3'	Amplicon (pb)	TA	Acesso NCBI
<i>Calreticulin (CRT)</i>	F: GACTTCCAATCACCTGGATCTT	111	60	XM_008471500.1
	R: GAGGAAGGAGGGAGGGATTAT			
<i>Laccase (Lac)</i>	F: CATCTACACGGGCATCCATT	96	60	XM_008489589.2
	R: TAACCCTTTGGCGTCCATATC			
<i>ESCRT-III subunit ptotein Snf7 (Snf7)</i>	F: CTTACGCACGGGAAATAAATG	98	60	XM_008471791.2
	R: AACTCTACACTCCACACAGAATAAA			
<i>Ribosomal protein L7 (RPL7)</i>	F: GAGGTGTTCACTGTTGGAGATAA	91	60	XM_008476740.1
	R: TCTTACGCCATCCTCCAGTA			
<i>Elongation factor 1 alpha (EF1α)</i>	F: ACCACCACCAACACATCTAC	119	60	XM_008479903.1
	R: ACTTCTTCTCCTCCTCTCATCT			
<i>Glyceraldeyde-3-phopate dehydrogenase (GAPDH)</i>	F: GACACTCACTCCTCCATCTTTG	96	60	XM_008481619.1
	R: GTATCCGTACTCGTTGTCATACC			

F – Foward, R – Reverse, TA - Temperatura de anelamento (°C)

3.3. Síntese de dsRNA

A sequência dos genes candidatos foi selecionada e clonada previamente pelo grupo de pesquisa em Fruticultura Tropical e Subtropical da ESALQ, e armazenada em pGEM-t Easy inserido em *Escherichia coli* DH5 α , em freezer -80°C. O dsRNA utilizado nos experimentos foi sintetizado *in vitro* com o kit MegaScript T7 (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. Para tal, primeiramente, o DNA plasmidial contendo as sequências dos genes de interesse foi extraído com kit MiniPrep Wizard (Promega). Em seguida, o DNA plasmidial foi linearizado com o auxílio de enzimas de restrição, sendo utilizada a enzima NcoI para linearizar as sequências dos genes alvos inseridos em pGEM-t Easy e a enzima SacI para linearizar o DNA plasmidial com a sequência do gene controle GFP inserido em pEGFP-N1.

Após a linearização e purificação da reação de digestão com kit específico, o DNA foi submetido a PCR com primers específicos para amplificação acrescidos da sequência T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGGAGA 3') nos primers forward e reverse (Tabela 2). Finalizada a reação de PCR, o DNA foi quantificado em fluorômetro Qubit (Invitrogen). O volume de reação utilizado na síntese de dsRNA foi de 20 μ l, constituído de 8 μ l de solução com mix de nucleotídeos, 2 μ l da enzima, 2 μ l de solução tampão e 8 μ l ou 1 μ g DNA e água para completar o volume. A reação de transcrição ocorreu a 37°C por, no mínimo, 20h. Após esse período, o dsRNA foi recuperado com cloreto de lítio (LiCl). Após a adição do LiCl, as amostras foram incubadas a -20°C, por 5 horas. O dsRNA precipitado foi coletado por centrifugação por 15 minutos a 14000 rpm a 4°C e, em seguida, realizou-se a lavagem com etanol 70%, seguida de centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm a 4°C. Após completa volatilização do etanol, o dsRNA foi ressuspensionado em água livre de RNase, quantificado em espectrofotômetro Nanodrop e armazenado a -20°C até o uso nos experimentos.

Tabela 2. Primers para síntese de RNA dupla fita (dsRNA)

Gene	Sequência 5' – 3'	Amplicon (pb)	TA	Acesso NCBI
<i>Calreticulin (CRT)</i>	F: <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAC</u> CCTGGAAGATGACTGGGAC	351	60	XM_008471500.1
	R: <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAC</u> AGATTTCGGGCTTGTAGTA			
<i>Laccase (Lac)</i>	F: <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAT</u> TGCCAACCATACTCTGACA	532	58	XM_008489589.2
	R: <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAA</u> ATGTGGGGAATCTGAAGG			
<i>ESCRT-III subunit ptotein Snf7 (Snf7)</i>	F: <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGAGG</u> AAATCAACATAGCCA	348	52	XM_008471791.2
	R: <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAG</u> GCTCATCCTCATCCACATCA			
<i>Green Fluorescent protein - pEGFP-N1 (GFP)</i>	F: <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAC</u> CCTGAAGTTCATCTGC	322	54	
	R: <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAG</u> TTGTGGCTGTTGTAGTTGT			

F – Foward, R – Reverse, TA - Temperatura de anelamento (°C)

3.4. Bioensaios de sobrevivência de *Diaphorina citri* alimentada com dsRNA para silenciamento gênico por RNA de interferência

O efeito do silenciamento dos genes candidatos *DcCRT*, *DcLAC* e *DcSNF7* e do gene controle (*GFP*) na sobrevivência dos insetos foi avaliado por meio do fornecimento do dsRNA para silenciamento nas doses, 0, 5, 25 e 50 µg de dsRNA de cada gene-alvo e do gene controle.

O método de entrega de dsRNA adotado foi o descrito por Andrade e Hunter (2017), no qual o dsRNA é fornecido através de uma folha destacada. Para este estudo, utilizaram-se folhas recém-expandidas de murta-de-cheiro, com 8-9 folíolos, coletadas entre 20 e 30 dias após a poda. Para isso, o pecíolo de cada folha foi imerso em 50 µL de solução de dsRNA, contendo 0 (apenas água livre de RNases), 5, 25 e 50 µg de dsRNA do gene a ser silenciado, até a completa absorção (6-7 horas). Após a absorção da solução de dsRNA, a manutenção da turgidez das folhas foi realizada apenas com água. Cada local de alimentação foi constituído de uma folha, onde foram colocados 10 adultos, não sexados, com 10 dias após a emergência (Figura 1).

A sobrevivência dos insetos alimentados nas folhas tratadas foi calculada pela contagem do número de insetos em cada local de alimentação, diariamente, por 6 dias. Dessa forma, a porcentagem de sobrevivência dos insetos foi calculada 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h após o início da alimentação. Devido à perda de turgidez das folhas 72h após o tratamento com dsRNA, estas foram trocadas por novas folhas tratadas, e os insetos transferidos para as mesmas, onde foram mantidos até o final do bioensaio. O delineamento experimental utilizado foi Delineamento Inteiramente Casualizado com 4 repetições, sendo cada repetição composta por um local de alimentação contendo uma folha tratada com uma dose de dsRNA do gene-alvo em avaliação e 10 insetos. Os experimentos de sobrevivência com os genes candidatos foram realizados duas vezes.

Figura 1. Arenas de confinamento de insetos para alimentação em folhas destacadas, confeccionadas com tubo Falcon de 50 mL. Essas arenas de alimentação foram utilizadas nos bioensaios de sobrevivência e de silenciamento.

3.5. Determinação de silenciamento gênico no psíldeo *Diaphorina citri* alimentado com dsRNA

Para verificação do efeito do dsRNA no silenciamento dos genes candidatos ao longo do período de alimentação, o dsRNA foi entregue aos insetos de acordo com a metodologia de Andrade e Hunter (2017), descrita no item 3.4. Neste bioensaio, coletaram-se 30 insetos alimentados com cada dose (0, 5, 25 e 50 µg) de dsRNA para cada gene candidato *DcCRT*, *DcLAC*, *DcSNF7* e também do gene controle *GFP*, 12h, 24h, 48h, 72h e 96 horas após o início da alimentação. Os insetos coletados nos bioensaios foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido e mantidos em congelamento a -80°C, para preservação do RNA. O delineamento experimental adotado foi Delineamento Inteiramente Casualizado com três repetições para cada tratamento, sendo cada repetição composta por 4 insetos submetidos à extração de RNA.

O RNA total foi extraído com o reagente TRIzol® (Invitrogen), de acordo com protocolo específico e sua pureza e quantidade verificadas em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA) e sua integridade verificada em gel de agarose 1%. Antes da síntese de cDNA, realizou-se o tratamento com DNase I para degradação do DNA genômico.

O cDNA foi sintetizado com enzima M-MLV RT (Fermentas, Waltham, MA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, a partir de 500 ng de RNA livre de DNA genômico. A concentração adequada de cDNA utilizada foi determinada por meio da diluição seriada 1:5, 1:25, 1:125, 1:625, sendo o cDNA diluído na proporção 1:5 e armazenado a -20°C até o seu uso. O silenciamento gênico nos insetos tratados com dsRNA foi quantificado por meio de RT-qPCR com o reagente GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, EUA) em um equipamento Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, EUA) com o mesmo ciclo e volume de reação descrito no item 3.3.

A expressão dos genes em cada tratamento foi calculada de acordo com a fórmula descrita por Pfaffl (2001). O tratamento 0 µg foi utilizado como controle no cálculo da expressão. Foram utilizados dois genes de referência (*EF1α* e *GAPDH*) como normalizadores selecionados de acordo com sua estabilidade (Tabela 1).

3.6. Quantificação da alimentação de *D. citri* que ingeriram dsRNA para silenciamento

O experimento para quantificação da alimentação dos insetos foi realizado apenas com os dsRNA cujos efeitos estão associados à alimentação, ou seja, os dsRNA para silenciamento dos genes *DcCRT* e *DcLAC*. Dessa forma, folhas destacadas de murta-de-cheiro foram tratadas com dsCRT, dsLAC e o gene-controle dsGFP nas doses 0, 5, 25 e 50 µg. As folhas de murta-de-cheiro receberam o tratamento da mesma forma como descrito no item 3.4. Contudo, a arena de alimentação para este bioensaio foi construída com placas de Petri de 60x15 mm, de forma a permitir a coleta do honeydew em discos de papel filtro qualitativo de 55 mm de diâmetro, alocados dentro de cada placa (Figura 2). A quantificação da alimentação dos insetos foi determinada por meio de detecção de aminoácidos excretados junto ao honeydew e depositados sobre o papel filtro. Para isso, coletou-se o papel filtro de cada arena de alimentação 120 horas após o início da alimentação dos insetos. Os papéis filtro passaram por secagem natural por 24h, e em seguida foram imersos em solução de acetona e ninhidrina (2%), por 5 minutos, seguida de secagem natural por 24h. Em seguida, os papéis filtro foram fotografados e a área corada quantificada por meio do software ImageJ (ImageJ 1.44p, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://imagej.nih.gov/ij>).

Figura 2. Arena de alimentação utilizada no bioensaio de alimentação, permitindo a coleta de honeydew em papel filtro (A). Papel filtro coletado 120 horas após o início da alimentação e tratado com ninhiidrina (2%) para, em seguida, quantificar-se a área corada (B).

3.7. Teste de distribuição de dsRNA pela folha e aquisição pelo inseto

A distribuição e aquisição do dsRNA pelo inseto foi determinada por meio da síntese e fornecimento aos insetos de moléculas de dsRNA marcados com fluoróforo. A síntese do dsRNA marcado foi realizada por meio de transcrição *in vitro*, como descrito no item 3.3, sendo adicionado o ribonucleotídeo CTP conjugado ao fluoróforo Cy3 (GE Helthcare Life Science, Diegem, Bélgica). Após sua síntese, o dsRNA Cy3-labbed foi recuperado por meio do kit de purificação Mega Clear (Ambion – Life Technologies), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

O dsRNA purificado foi fornecido aos insetos da mesma forma que o dsRNA dos genes candidatos (item 3.4). A concentração de dsRNA Cy3-labbed utilizada foi de 25 µg. A observação da distribuição do dsRNA marcado nas folhas de murta-de-cheiro foi realizada por meio de coleta e secções transversais e longitudinais do pecíolo e folíolos efetuados em micrótomo Leica MS 2000R (Leica), seguida de observação em microscópio Confocal Nikon C200 (Nikon) 24 e 72 horas após a absorção da solução contendo o dsRNA.

Os insetos alimentados em folhas tratadas com dsRNA Cy3-labbed foram fixados em paraformaldeído. A retirada do trato digestório foi realizada em tampão fosfato pH 8,2 com o

auxílio de agulhas. Os tratos digestórios extraídos e insetos inteiros foram observados em microscópio Confocal Nikon C200 (Nikon), 24 e 72 horas após início da alimentação.

3.8. Análise Estatística

Os dados coletados nos experimentos foram submetidos à análise de variância, e quando significativa, ao teste de comparações múltiplas Tukey ao nível de 0,05 de probabilidade. Os dados dos dois experimentos de sobrevivência dos insetos foram analisados conjuntamente, uma vez que não houve diferença estatística entre os experimentos. Esses dados também foram submetidos à transformação em $\arcsen\sqrt{p}$ uma vez que não atenderam os pressupostos básicos para realização da análise de variância. De forma semelhante, os dados dos experimentos para quantificação da alimentação foram transformados em $\sqrt{(x + 0,5)}$ para posterior realização da análise de variância e teste de comparações múltiplas.

4. RESULTADOS

4.1. Expressão dos genes candidatos em diferentes estádios de desenvolvimento dos insetos

A expressão dos genes *DcCRT* e *DcSNF7* se mostraram constantes ao longo de todos os estágios de desenvolvimento dos insetos (Figura 3). Entretanto, a expressão do gene *DcLAC* apresentou um significativo aumento de sua expressão no estágio de insetos adultos recém emergidos (A1D), ou seja, de até seis vezes superior à expressão deste gene nos estágios ninfaís. Contudo, nos adultos que atingiram a maturidade sexual (A10D), observou-se redução da expressão do gene *DcLAC* para próximo de 2, patamar semelhante ao observado nos estágios juvenis (Figura 3).

Figura 3. Expressão dos genes *CRT*, *LAC* e *SNF7* em diferentes estádios de desenvolvimento de *Diaphorina citri*. Sendo: N12 – ninfas de 1° e 2° íntares, N3 – ninfas de 3° instar, N45 – ninfas de 4° e 5° íntares, A1D – adultos recém emergidos (24h de idade) e A10D – adultos após 10 dias após a emergência (não sexados). Letras diferentes indicam diferença de expressão entre os estádios de desenvolvimento pelo teste Tukey ($p < 0.05$).

4.2. Sobrevivência de *D. citri* em função da dose de dsRNA

O efeito do dsRNA no silenciamento gênico por RNAi é dependente de sua concentração fornecida ao inseto. Desta forma, foram utilizadas quatro doses de dsRNA, 0, 5, 25 e 50 µg para cada tratamento. Os resultados dos experimentos revelaram que a sobrevivência dos insetos não foi afetada pela alimentação com dsCRT ao longo do período de avaliação (Figura 4A), diferente do que foi observado nos insetos alimentados com outros dsRNAs avaliados (Figura 4). A sobrevivência dos insetos alimentados com dsRNA para silenciamento do gene *DcLAC* foi menor nas doses 50 µg de dsLAC e 25 e 50 µg dsLAC em relação aos alimentados com 5 µg, 72 horas e 120 horas após o início da alimentação, respectivamente. Entretanto, é importante ressaltar que não foi observada diferença na sobrevivência dos insetos alimentados com as doses de dsLAC e a dose controle (0 µg) em nenhum momento de avaliação para este gene alvo (Figura 4B).

Os insetos alimentados com dsRNA para silenciamento do gene *DcSNF7* não apresentaram alteração na sobrevivência até 120 horas após o início da alimentação. Por outro lado, registrou-se redução na sobrevivência dos insetos alimentados com 5 µg de dsRNA apenas após 144 horas de alimentação (Figura 4C). Por outro lado, os insetos alimentados com dsRNA do gene controle GFP apresentaram menor sobrevivência quando alimentados com 5 e 50 µg de dsRNA do que os alimentados com 25 µg de dsRNA, 120 horas após o início da alimentação. Porém, neste mesmo momento de avaliação, não houve diferença na sobrevivência dos insetos alimentados com dsGFP e o controle (0 µg). Adicionalmente, foi observada diferença na sobrevivência dos insetos, 144 horas após o início da alimentação, sendo que, a sobrevivência dos psilídeos foi maior quando alimentados com 25 µg de dsGFP do que quando alimentados com o controle (0 µg), 5 µg e 50 µg de dsGFP.

Figura 4. Efeito de dose-resposta da alimentação de *Diaphorina citri* com dsRNA para silenciamento dos genes alvo *DcCRT* (A), *DcLAC* (B) e *DcSNF7* (C) e do controle GFP (D) na sobrevivência dos insetos. Letras diferentes indicam diferença entre tratamentos, na mesma data de avaliação, pelo teste Tukey ($p < 0.05$).

4.3. Expressão dos genes alvo de psílídeo *Diaphorina citri* alimentado com dsRNA

A alimentação de *D. citri* com os diferentes tratamentos com dsRNA levaram ao silenciamento dos genes *DcCRT* e *DcLAC*. A expressão do gene *DcCRT* não foi alterada em insetos alimentados com o dsRNA do gene controle *GFP* durante a avaliação (Figura 5A). Por outro lado, a expressão do gene *DcCRT* foi reduzida 12 horas após o início da alimentação com 5, 25 e 50 µg de dsCRT, não havendo diferença no silenciamento entre essas doses de dsRNA. Contudo, 24 horas após o início da alimentação, constatou-se variação na expressão do gene *DcCRT* entre os insetos alimentados com 5 µg e 25 µg, sendo que os insetos tratados com 25 µg de dsRNA apresentaram redução na expressão do gene alvo *DcCRT*. Apesar de se constatar diferença na expressão do gene *DcCRT* entre essas doses (5 µg e 25 µg), não foi possível observar diferença entre estes tratamentos e a dose controle (0µg) (Figura 5B).

Após 48 e 72 horas de alimentação, não foi observada diferença na expressão de *DcCRT* em função dos tratamentos. Por outro lado, 96 horas após o início da alimentação, observou-se redução da expressão de *DcCRT* em insetos alimentados com 5 µg em comparação aos tratados com 50 µg de dsRNA para silenciamento. Embora constatou-se diferença na expressão do gene alvo entre as doses 5 µg e 50 µg, não foi observada diferença na expressão do gene alvo em insetos tratados com estas doses e aqueles tratados com a dose controle (0 µg de dsCRT) (Figura 5B).

A expressão do gene *DcLAC* não foi afetada pelas doses de dsRNA do gene controle GFP, durante todo o período de avaliação (Figura 5C), assim como não foi afetada após 12, 24 e 72 horas de alimentação nos insetos que receberam o dsRNA para silenciamento do gene *DcLAC*. Por outro lado, 48 horas após o início da alimentação, foi observado aumento da expressão do gene *DcLAC* nos insetos alimentados com 25 µg de dsLAC, em comparação aos alimentados com as outras doses de dsLAC. Em contrapartida, houve redução na expressão de *DcLAC* nos insetos alimentados com 5, 25 e 50 µg de dsLAC em comparação à dose controle de 0µg de dsLAC 96 horas após o início da alimentação (Figura 5D). A expressão de *DcSNF7* não foi afetada pelos tratamentos, 0, 5, 25 e 50 µg de dsRNA do gene controle GFP e 0, 5, 25 e 50 µg de dsRNA para silenciamento do gene alvo *DcSNF7*, em todas as datas de avaliação (Figura 5 E e F).

Figura 5. Efeito da dose de dsRNA na expressão dos genes alvo ao silenciamento. Expressão do gene *DcCRT* em insetos alimentados com diferentes doses de dsRNA do gene controle GFP (A) e alvo dsCRT (B). Expressão do gene *DcLAC* em insetos alimentados com diferentes doses de dsGFP (C) e dsLAC (D). Expressão do gene *DcSnf7* em insetos alimentados com diferentes doses de dsGFP (E) e dsSNF7 (F). Letras diferentes indicam diferença pelo teste Tukey ($p < 0.05$) na mesma data de avaliação.

4.4. Efeito de dsRNA para silenciamento na alimentação de *D. citri*

Os genes candidatos *DcCRT* e *DcLAC* estão relacionados a atividade alimentar do inseto *D. citri*. Dessa forma, além das análises de sobrevivência e silenciamento, também se realizou um bioensaio para verificar o efeito das doses de dsRNA destes genes na alimentação de insetos adultos. A quantificação da alimentação por meio da coloração de aminoácidos excretados no honeydew indicou que, dentre os insetos alimentados com dsRNA para silenciamento do gene *DcCRT*, a dose de 5 µg de dsCRT foi a única que induziu a redução da alimentação dos insetos (Figura 6). De modo semelhante, houve redução da alimentação, em comparação à dose 0µg, naqueles insetos alimentados com 5 µg de dsRNA para silenciamento do gene alvo *DcLAC*. Além disso, observou-se um aumento na quantidade de aminoácidos excretados nos insetos alimentados com 25 µg de dsLAC, diferente do que ocorreu em insetos alimentados com 50 µg de dsLAC. Contudo, apesar de ter sido observada uma diferença no comportamento alimentar dos insetos tratados com essas doses de dsLAC (25 e 50 µg), não foi observada diferença destas com a dose controle (0 µg de dsLAC) (Figura 6). Além dos genes candidatos ao silenciamento, também se quantificou a alimentação de insetos tratados com diferentes doses de dsRNA do gene controle *GFP*, não sendo observda diferença na quantidade de aminoácidos excretados em função dos tratamentos (Figura 6).

Figura 6. Efeito da dose de dsRNA alimentação de *D. citri*. Quantificação da alimentação de insetos tratados com dsRNA dos genes alvo dsCRT e dsLAC e gene controle dsRNA GFP. Letras diferentes indicam diferença pelo teste Tukey ($p < 0.05$).

4.5. Distribuição de dsRNA pela folha e aquisição pelo inseto

A distribuição de dsRNA através da folha e aquisição pelo inseto foram observadas por meio de análise em microscópio confocal. Com imagens obtidas, constatou-se a ausência de compostos excitados com o comprimento de onda de 561 nm nos vasos do xilema no tratamento controle. Por outro lado, nas folhas tratadas com dsRNA Cy3-labeled, observou-se a distribuição do mesmo no comprimento de onda de 561 nm (Figura 7). Os cortes transversais do pecíolo permitiram observar a distribuição do dsRNA Cy3-labeled através dos elementos de vaso e traqueídes do xilema (Figura 7G e H). Além disso, foi possível observar que, com o passar do tempo, ou seja, de 24 horas para 72 horas após a absorção do dsRNA Cy3-labeled, houve distribuição de dsRNA pelas células do xilema (Figura 7E-L). Assim como nos cortes transversais, nos cortes longitudinais, constatou-se a presença de dsRNA Cy3-labeled nas células do xilema (Figura 7Q-X) das folhas tratadas, com aumento de intensidade ao longo do tempo. Enquanto que no controle, não foi possível observar qualquer substância excitada com o comprimento de onda de 561 nm, nas células do xilema (Figura 7M-P).

Não foi possível observar o dsRNA Cy3-labbed no trato digestório dos insetos devido a uma forte autofluorescência (Figura 8). Contudo, devido aos experimentos de silenciamento gênico, foi possível confirmar que o dsRNA, não só é adquirido pelo inseto, como também apresenta efeito de silenciamento.

Figura 7. Distribuição de dsRNA Cy3-labeled nos tecidos do pecíolo de *Murraya paniculata* 24 horas e 72 horas após absorção. Pecíolo de *Murraya paniculata* após absorção de água livre de RNase (Controle), em secções transversais (A-D) e longitudinais (M-P) e após absorção de dsGFP-Cy3-labeled, em cortes transversais (E-L) e longitudinais (Q-X). EP- Epiderme, FL-Floema, M-Medula e X-Xilema. Filtros: eGFP- 488nm, Cy3- 561nm e DAPI- 405nm.

Figura 8. Teste de aquisição de dsGFP Cy3-labeled por *D. citri*, via alimentação em folha de *M. paniculata* que absorveu dsGFP. Trato digestório de *D. citri* alimentados em folha que recebeu tratamento controle (A-C) e que recebeu solução contendo 25 µg de dsGFP, 72 horas após absorção do mesmo (D-G). TM – Túbulos de Mapighi. Filtros: eGFP- 488nm, Cy3- 561nm

5. DISCUSSÃO

O silenciamento gênico por RNA de interferência tem sido estudado de forma ampla, como ferramenta para o controle de pragas, inclusive de insetos sugadores de seiva, em várias culturas de interesse econômico como psilídeo-asiático-dos-citros. Tal interesse se deve principalmente, a especificidade da molécula de dsRNA ao silenciamento gênico por RNAi o que permite que espécies de insetos sejam controladas de forma seletiva, contribuindo com o MIP, uma vez que não causa mortalidade em insetos não-alvo, tais como abelhas e inimigos naturais (JOGA et al. 2016; JAOUANNET et al. 2014). O desenvolvimento de estratégias de controle de insetos por meio de silenciamento por RNA tem sido realizado em duas linhas de atuação, por meio da obtenção de plantas transgênicas que expressam *hairpin* de silenciamento, ou por métodos não-transformantes, sendo o dsRNA entregue ao inseto por meio de água de irrigação, encapsulado em nanopartículas ou em bactérias, e como viroses (JOGA et al., 2016).

Embora os protocolos de transformação de plantas cítricas estejam consolidados, esse processo é lento e oneroso, sendo, portanto, desejável a realização de testes preliminares, *in vitro*, para confirmar a eficácia da construção ou gene em questão. A seleção de genes candidatos ao silenciamento via RNAi não é diferente (GALDEANO et al., 2017; YU, GOWDA, KILLINY, 2017; SANTOS-ORTEGA; KILLINY 2018; TANING et al., 2016). Para a realização de tais testes, optou-se pela entrega do dsRNA por meio do sistema *in planta*, descrito por Andrade e Hunter (2017), o qual consiste na utilização de uma folha destacada, que absorve a solução contendo o dsRNA para silenciamento do gene alvo, junto à qual os insetos são confinados, permitindo sua alimentação e, conseqüentemente, a aquisição do dsRNA. As análises de microscopia com dsRNA Cy3-labbeled permitiram observar que o transporte das moléculas de dsRNA ocorre pelos elementos de vaso e taqueídes do xilema. Apesar de *D. citri* se alimentar de seiva floemática, este também ingere seiva do xilema para sua hidratação e para aliviar o efeito osmótico causado pela ingestão da seiva do floema (BONANI et al., 2010, CEN et al., 2012, WILL, VAN BELL, 2006). O fato de não ser observado moléculas de dsRNA Cy3-labbeled no floema pode ser um dos motivos da baixa mortalidade dos insetos tratados com dsRNA, uma vez que essa é a principal forma de alimentação do inseto.

Não foi possível comprovar a aquisição das moléculas de dsRNA Cy3-labbeled pelo inseto, por meio das análises de microscopia, devido a uma elevada autofluorescência observada no trato digestório dos insetos não alimentados com dsRNA (Figura 8). Porém, constatou-se que ocorreu a aquisição do dsRNA pelo inseto devido a observação do

silenciamento parcial dos genes *DcCRT* e *DcLAC* nos insetos que receberam o dsRNA para silenciamento destes (Figura 5).

Os bioensaios realizados para observar a sobrevivência dos insetos mostraram que houve fenótipo letal para o gene alvo *DcSnf7*, após 144 horas de alimentação. A proteína DcSnf7 é um componente essencial do complexo ESCRT-III (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III*), envolvido no transporte e degradação de proteínas, portanto, o silenciamento pós-transcricional do gene *DcSnf7* pode causar deficiência nas rotas autofágicas e de de-ubiquitinação, levando o inseto à morte (KOCI et al. 2014). Em estudos com *D. virgivera* subsp. *virgivera*, Bolonhesi et al. (2012) constataram que o silenciamento do gene *DvSnf7* foi potencializado com o tempo de exposição dos insetos a dieta contendo o dsRNA. Naquele estudo, constatou-se fenótipo letal em larvas a partir do quinto dia após sua exposição das larvas por 24 horas em dieta contendo dsRNA (BOLONHESI et al 2012), o que evidencia que o tempo de exposição é crucial para observação de mortalidade de insetos, via silenciamento gênico.

Por outro lado, para os outros genes alvo, *DcCRT* e *DcLAC*, não foi observado efeito do dsRNA na sobrevivência dos insetos em comparação ao controle (água). A eficácia do controle de insetos pelo método de silenciamento por RNA é dependente de uma série de fatores, tais como o método de entrega do dsRNA, a sequência do gene alvo, o tamanho do fragmento de dsRNA e a persistência do efeito do silenciamento (HUVENNE; SMAGGHE, 2010; JOGA et al. 2016). Dessa forma, a aquisição de dsRNA pelo inseto pode levar ao silenciamento gênico e alterações metabólicas, que podem ser prejudiciais ao inseto, mas que não apresentem efeito letal. A ausência de efeito letal é comum em estudos com RNAi em afídeos, principalmente, cujos métodos de entrega de dsRNA envolvem a alimentação e, consequentemente, a passagem da molécula de RNA dupla-fita pelo trato digestório do inseto (PITINO et al., 2011; MAO, ZHENG, 2014; DENG, ZHAO, 2014; SHAKESBY et al., 2009; GUO et al. 2014; XU et al., 2014). A menor eficiência do silenciamento gênico e efeito na sobrevivência do inseto pode estar relacionado à degradação de parte do dsRNA no intestino, ou por substâncias secretadas pelas glândulas salivares, no momento da alimentação. Essa degradação pode ocorrer devido ao pH dos tecidos, pois, o dsRNA é instável em condições de pH alcalino ou devido à presença de dsRNases no trato digestório dos insetos (YU et al. 2015). A ausência de fenótipo letal foi observada em experimentos com outros hemípteros, como o pulgão *Myzus persicae* alimentados em plantas de tabaco expressando dsRNA para silenciamento do gene *hunchback*, no qual houve apenas redução na expressão do gene-alvo (MAO, ZHENG, 2014). Em estudos com o pulgão-da-espiga, *S. avenae*, Deng e Zhao (2014) também observaram apenas o

silenciamento do gene-alvo *CAT* (catalase), sem ocorrência de fenótipo letal. Em *D. citri*, reduções da expressão do gene-alvo e efeitos metabólicos também têm sido relatadas. Santos-Ortega e Kiliny (2018) observaram redução da expressão do gene *DcSuh*, em ninfas e adultos tratados com dsRNA e redução da atividade da proteína *sucrose hydrolase*; entretanto, não houve aumento de mortalidade nos insetos. Por outro lado, Tanning et al. (2016) constataram redução na sobrevivência de insetos alimentados com dsRNA para silenciamento dos genes *SOD* (*Superoxide Dismutase*) e *AK* (*Arginine kinase*) de *D. citri*, 7 dias após o início da alimentação em folhas destacadas de citros. Cabe ainda destacar que os genes-alvo, *pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase* (*PCDB1*), *tomosyn* (*TOM*) e *vitellogenin* (*VIT*), não afetaram significativamente a sobrevivência dos insetos, mesmo com 15 dias de alimentação (TANING et al. 2016). Esses resultados mostram o quanto a eficiência do dsRNA é dependente do gene a ser silenciado.

Além da sequência do gene-alvo, a dose de dsRNA administrada também é considerado um fator determinante para a eficiência do silenciamento gênico. Nos bioensaios de sobrevivência buscando o silenciamento do gene *DcSnf7*, os insetos alimentados com 5 µg de dsSnf7 apresentaram pouco mais de 60% de sobrevivência, em comparação a mais de 80% observada no controle (água). Por outro lado, os insetos que receberam 5 µg de dsLAC apresentaram redução da mortalidade às 72 e 96 horas após o início da alimentação, em comparação às outras doses de dsRNA (25 e 50 µg). Em estudos de dose resposta de dsRNA em *D. citri*, foi possível observar que, de modo geral, não há uma relação entre as maiores doses utilizadas e maior eficiência de dsRNA (SANTOS-ORTEGA, KILINY, 2018; GALDEANO et al., 2017; YU, GOWDA, KILLINY, 2017). Santos-Ortega e Kiliny (2018) observaram que a injeção de 100 ng de dsRNA foi suficiente para reduzir a expressão relativa do gene *DcSuh* e reduzir a longevidade dos insetos. Em outro caso, Galdeano et al (2017) comprovaram que não há efeito de doses superiores a 200 ng µL⁻¹ de dsRNA, dos genes-alvo *cathepsin D* (*CD*), *chitin synthase* (*CS*) e *inhibitor of apoptosis* (*IA*), no silenciamento e sobrevivência dos insetos, inclusive, houve redução da mortalidade dos insetos tratados com 500 e 1000 ng µL⁻¹ de dsRNA para silenciamento dos genes *CD* e *IA*, comparados aos tratados com 200 ng µL⁻¹.

A análise de expressão gênica dos insetos, ao longo do tempo, mostrou que os insetos alimentados com o dsRNA para silenciamento do gene *DcSnf7* não apresentaram redução na expressão gênica no período avaliado. Contudo, apesar disso foi observado efeito letal de tal gene 144 horas após o início da alimentação, o que pode indicar que o silenciamento gênico iniciou após o período de avaliação da expressão gênica. De forma similar, Prentice et al. (2017) também não observaram redução na expressão do gene *Snf7* no gorgulho *Cylas puncticollis*

(Coleoptera: Brentidae) após 5 dias de alimentação. Entretanto, Bolognesi et al. (2012), não somente observaram a redução na expressão gênica, mas também constataram a mortalidade de larvas alimentadas com dsRNA *DvSnf7* em dieta artificial por 12 dias. Além disso, em seu estudo pioneiro referente ao uso de RNAi para o controle de pragas, Baum et al. (2007) sugeriram o gene *Snf7* como candidato promissor ao silenciamento gênico em *D. virgifera* subsp. *virgifera*. Estudos subsequentes buscaram entender os mecanismos envolvidos e as alterações celulares decorrentes do silenciamento deste gene (RAMASESHADRI et al., 2013; KOCI et al., 2014; BOLOGNESI et al., 2012). Contudo, a eficiência do silenciamento gênico por RNAi é variável em função da ordem taxonômica à qual o inseto pertence. Em coleópteras, como a *D. virgifera* subsp. *virgifera*, o dsRNA atua de forma sistêmica sendo eficiente no silenciamento. Por outro lado, em insetos pertencentes às ordens Lepidoptera, Diptera e Hemiptera o processo ocorre de forma diferente (MOGILICHERLA, HOWELL, PALLI, 2018). Por exemplo, o transporte de dsRNA nas células e tecidos é diferente entre lepidópteras e coleópteras, uma vez que em coleópteras o dsRNA é processado em siRNA resultando em silenciamento do gene alvo. Nos insetos lepidópteras, parte do dsRNA é acumulado em corpos ácidos e endossomos, não sendo processados em siRNA e consequentemente reduzindo o efeito do silenciamento (SHUKLA et al. 2016). Em afídeos, o efeito do silenciamento gênico é variável entre as espécies, sendo associado a menor eficiência do dsRNA, a degradação que pode ocorrer na hemolinfa e na secreção salivar (CHRISTIAENS, SWEVERS, SMAGGHE, 2014; CHRISTIAENS, SMAGGHE, 2014). Apesar das dificuldades encontradas no silenciamento por RNAi em insetos pertencentes à ordem Hemiptera, neste estudo foi observado silenciamento dos genes *DcLAC* e *DcCRT*, em *D. citri*.

Em insetos alimentados com dsLAC e dsCRT, foi possível observar efeito do dsRNA na expressão do gene alvo. Em insetos alimentados com dsCRT, constatou-se redução de 50% na expressão do gene *DcCRT* 12 horas após o início da alimentação dos insetos. Após esse período, as expressões do gene-alvo nos insetos alimentados com dsRNA e água (controle) se mantiveram semelhantes até 96 horas após o início da alimentação. Por outro lado, no bioensaio com insetos alimentados com dsRNA para silenciamento do gene *DcLAC*, observou-se um aumento na expressão do mesmo 48 horas após o início da alimentação, seguida de estabilização, e redução da expressão do gene *DcLAC* nos insetos tratados com dsRNA apenas após 96 horas de alimentação. A divergência nos resultados de silenciamento entre os genes estudados pode estar relacionada à natureza destes, uma vez que, a sequência de nucleotídeos do gene alvo e o comprimento do fragmento de dsRNA têm efeito determinante na eficiência do silenciamento gênico (JOGA et al., 2016). Além disso, Burand e Hunter (2013) afirmaram

que a suscetibilidade dos tecidos do inseto ao efeito do silenciamento gênico por RNAi é variável, sendo os tecidos mais suscetíveis os embrionários, as células do intestino e os hematócitos. Por outro lado, o silenciamento de genes presentes nas glândulas salivares é de maior dificuldade. Em alguns casos, a resistência dos tecidos ao silenciamento gênico pode ser superada pela quantidade de dsRNA fornecido, como demonstrado por Boisson et al. (2006), que, para o sucesso no silenciamento de genes de glândula salivar, utilizaram quantidade 10 vezes superior de dsRNA do que para silenciar genes de outros tecidos, como intestino e hematócitos de mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae), explicando a divergência na eficiência de ação dos dsRNAs em estudo. Contudo, apesar de se observar o silenciamento dos genes *DcLAC* e *DcCRT*, não foi observado fenótipo letal 144h após o início da alimentação. Dessa forma, foi realizado estudo para quantificar a alimentação dos insetos, e verificar se houve algum efeito do silenciamento desses genes em tal processo.

O bioensaio para quantificação da alimentação mostrou que, apesar da não letalidade do silenciamento dos genes *DcLAC* e *DcCRT*, houve redução na ingestão de alimento dos insetos após 5 dias de alimentação contínua com 5 µg de dsLAC e dsCRT. Este resultado mostra que a dose de 5 µg de dsRNA foi suficiente para causar efeito na alimentação dos insetos, e que as doses maiores utilizadas (25 e 50 µg) não influenciaram a quantidade de alimento ingerido pelo inseto. Este resultado corrobora com outros descritos em *D. citri*, nos quais deixam evidente que não há uma relação entre as maiores doses utilizadas e maior eficiência de dsRNA (SANTOS-ORTEGA; KILINY, 2018; GALDEANO et al., 2017; YU; GOWDA; KILLINY, 2017). Além disso, a redução da alimentação indica que o dsRNA para silenciamento dos genes *DcCRT* e *DcLAC* causou efeito estressante no inseto durante o período avaliado. A não observação de fenótipo letal, neste caso, pode ter ocorrido devido ao tempo de exposição dos insetos ao dsRNA, uma vez que não houve redução da alimentação por tempo suficiente para causar morte por inanição. A função desempenhada pelos genes *DcCRT* e *DcLAC* indicam que o silenciamento dos mesmos, causa efeito deletério no processo alimentar, pois, *DcCRT* está diretamente relacionado a manutenção da alimentação nos elementos crivados, enquanto *DcLAC* está diretamente relacionada a formação da bainha estiletar (WIL, VAN BEL, 2013). Portanto, é de se teorizar que o fenótipo letal será observado devido a redução da alimentação e conseqüentemente morte por inanição.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, pode-se concluir que:

- Não houve redução da sobrevivência dos insetos alimentados com dsRNA para o silenciamento dos genes *DcCRT* e *DcLAC*. O fenótipo letal foi observado apenas nos insetos alimentados com dsRNA para silenciamento do gene *DcSNF7*, 144 horas após o início da alimentação.
- A alimentação com dsRNA para silenciamento gênico levou a redução da expressão dos genes-alvo *DcCRT* e *DcLAC*, 12 e 96 horas após o início da alimentação, respectivamente. Não foi observada redução na expressão do gene *DcSNF7*.
- Houve redução na quantidade de aminoácidos excretados pelos insetos alimentados com 5 µg de dsRNA para silenciamento dos genes *DcCRT* e *DcLAC*.
- A partir das análises de microscopia, pode-se observar que ocorre o transporte de dsRNA através dos vasos do xilema, mas não foi encontrado dsRNA nas células do floema. Também não foi possível observar o dsRNA Cy3-labeled no corpo do inseto.

REFERÊNCIAS

- ANGAJI, A. S.; HEDAYATI, S. S.; POOR, R. H.; POOR, S. S.; SHIRAVI, S.; MADANI, S. Application of RNA interference in plants. *Plant OMICS*, v. 3, n. 3, p. 77–84, 2010.
- AMMAR, E.D.; SHATTERS, R. G.; LYNCH, C.; HALL, D. G. Detection and Relative Titer of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the Salivary Glands and Alimentary Canal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) Vector of Citrus Huanglongbing Disease. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 104, n. 3, p. 526–533, 2011.
- AMMAR, E. 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, n. 11–12, p. 726–734, 2011.
- ANDRADE, E. C.; HUNTER, W. B. RNAi feeding bioassay: development of a non-transgenic approach to control Asian citrus psyllid and other hemipterans. *Entomol Exp Appl*, v. 162, p. 389–396, 2017. doi:10.1111/eea.12544
- ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S.; BEEMAN, R. W.; KANOST, MICHAEL R. KRAMER, K. J. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *PNAS*, v. 102, n. 32, p. 11337–11342, 2005.
- BASSAN, M.M., ANGELOTTI-MENDONÇA, J., ALVES, G.R., YAMAMOTO, P.T., MOURÃO FILHO, F. A.A. Selection of Reference Genes for Expression Studies in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 110, n. 6, p. 2623–2629, 2017. <https://doi.org/10.1093/jee/tox253>
- BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; JÚNIOR, J. B.; SPÓSITO, M. B.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P. De; TEIXEIRA, D. D. C.; WULFF, N. A. Epidemiologia do huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. *Citrus Research & Technology*, v. 31, n. 1, p. 11–23, 2010.
- BAUM, J. A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G. R.; FELDMANN, P.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, v. 25, p. 1322–1326, 2007.
- BELASQUE JR., J.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P. De; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Controle do huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. *Citrus Research & Technology*, v. 31, n. 1, p. 53–64, 2010.
- BERGERON, J. J. M.; BRENNER, M. B.; THOMAS, D. Y.; WILLIAMS, D. B. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 19, n. 3, p. 124–128, 1994.
- BOISSON, B. J.; JACQUES, J.C.; CHOUMET, V.; MARTIN, E.; XU, J.; VERNICK, K.; BOURGOUIN, C. Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. *FEBS Letters*, v. 580, n. 8, p. 1988–1992, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.02.069>
- BOLOGNESI, R.; RAMASESHADRI, P.; ANDERSON, J.; BACHMAN, P.; CLINTON, W.; FLANNAGAN, R.; ILAGAN, O.; LAWRENCE, C.; LEVINE, S.; MOAR, W.; MUELLER, G.; TAN, J.; UFFMAN, J.; WIGGINS, E.; HECK, G.; SEGERS, G. Characterizing the Mechanism of Action of Double-Stranded RNA Activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLoS ONE*, v. 7, n. 10, 2012.
- BONANI, J. P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M. P.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; LOPES, J. R. S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 134, p. 35–49. 2010.
- 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.

- BRASIL, AGROPECUÁRIA, C. D. D. Dados da citricultura brasileira. Disponível em: <<http://www.defesa.agricultura.sp.gov.br>>. Acesso em: 25 mar. 2016.
- BURAND, J. P.; HUNTER, W. B. RNAi: Future in insect management. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 112, n. SUPPL.1, p. 68–74, 2013.
- CAROLAN, J. C.; CARAGEA, D.; REARDON, K. T.; MUTTI, N. S.; DITTMER, N.; PAPPAN, K.; CUI, F.; CASTANETO, M.; POULAIN, J.; DOSSAT, C.; TAGU, D.; REESE, J. C.; REECK, G. R.; WILKINSON, T. L.; EDWARDS, O. Predicted effector molecules in the salivary secretome of the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*): a dual transcriptomic/proteomic approach. *Journal of Proteome Research*, v. 10, p. 1505–1518, 2011.
- CEN, Y.; YANG, C.; HOLFORD, P.; BEATTIE, G. A.; SPOONER-HART, R. N.; LIANG, G.; DENG, X. Feeding behaviour of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected citrus. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 143, p. 13–22. 2012. doi:10.1111/j.1570-7458.2012.01222.x
- COLETTA FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DE NEGRI, J. D.; POMPEU, J.; MACHADO, M. A.; MULLER, G. W. First report of the agent of huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Disease*, v. 88, n. 12, p. 1382–1382, 2004.
- CHRISTIAENS, O.; SMAGGHE, G. The challenge of RNAi-mediated control of hemipterans. *Current Opinion in Insect Science*, v. 6, p. 15–21. 2014.
- CHRISTIAENS, O.; SWEVERS, L.; SMAGGHE, G. DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides*, v. 53, p. 307–314. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2013.12.014>
- CZECH, B.; HANNON, G. J. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nature reviews. Genetics*, v. 12, n. 1, p. 19–31, 2011.
- DA GRACA, J. V.; DOUHAN, G. W.; HALBERT, S. E.; KEREMANE, M. L.; LEE, R. F.; VIDALAKIS, G.; ZHAO, H. Huanglongbing: An Overview of a Complex Pathosystem Ravaging the World's Citrus. *Journal of integrative plant biology*, v. 58, n. 4, p. 373–387, abr. 2016.
- DENG, F.; ZHAO, Z. Influence of catalase gene silencing on the survivability of *Sitobion avenae*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, v. 86, p. 46–57. 2014. doi:10.1002/arch.21161
- DITTMER, N. T.; SUDERMAN, R. J.; JIANG, H.; ZHU, Y.-C.; GORMAN, M. J.; KRAMER, K. J.; KANOST, M. R. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect biochemistry and molecular biology*, v. 34, n. 1, p. 29–41, 2004.
- EAKTEIMAN, G.; MOSES-KOCH, R.; MOSHITZKY, P.; MESTRE-RINCON, N.; VASSÃO, D. C.; LUCK, K.; SERTCHOOK, R.; MALKA, O.; MORIN, S. Targeting detoxification genes by phloem-mediated RNAi: A new approach for controlling phloem-feeding insect pests. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 100, p. 10–21. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.05.008>
- EL-SHESHENY, I.; HAJERI, S.; EL-HAWARY, I.; GOWDA, S.; KILLINY, N. Silencing Abnormal Wing Disc Gene of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Disrupts Adult Wing Development and Increases Nymph Mortality. *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, p. 2–9, 2013.
- EL-SHESHENY, I.; HIJAZ, F.; EL-HAWARY, I.; MESBAH, I.; KILLINY, N. Impact of different temperatures on survival and energy metabolism in the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 192, p. 28–37, 2016.
- FAO. FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org>>. Acesso em: 25 set. 2018.

- FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998.
- FUNDECITRUS. 65% dos psílídeos de São Paulo carregam a bactéria do HLB. *Revista Citricultor*, n. 35, p. 6-7. 2016a.
- FUNDECITRUS. 2018-2019 orange crop forecast update for São Paulo and west-southwest Minas Gerais citrus belt – september/2018. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0918_Orange_Crop_Forecast_Update.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2018a.
- FUNDECITRUS. Crescimento barrado: Manejo regional e eliminação de plantas doentes mantém HLB estável. *Revista Citricultor*, n. 37, p. 12-14. 2016b.
- FUNDECITRUS. Pesquisa e desenvolvimento. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/greening>>. Acesso em: 10 nov. 2018b.
- FUNDECITRUS. PES: reestimativa da safra de laranja 2018/19 do Cinturão Citrícola de São Paulo e triângulo/sudoeste mineiro – fechamento em abril/2019. 2019.
- FUNDECITRUS. Produção estimada é de 288,9 milhões de caixas. *Revista Citricultor*, n.45, p. 12-15. 2018c.
- 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 adults of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *PLoS ONE*, v. 12, n. 3, p. 1–16, 2017.
- GHANIM, M.; ACHOR, D.; GHOSH, S.; KONTSEDALOV, S.; LEBEDEV, G.; LEVY, A. ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ accumulates inside endoplasmic reticulum associated vacuoles in the gut cells of *Diaphorina citri*. *Scientific Reports*, v. 7, n. 16945. 2017. DOI:10.1038/s41598-017-16095-w
- 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. 413–32, 2013. DOI: 10.1146/annurev-ento-120811-153542.
- GOTTWALD, T. R. Current Epidemiological Understanding on Citrus Huanglongbing. *Annual review of phytopathology*, v. 48, p. 119–139, 2010.
- GUIGUET, A.; DUBREUIL, G.; HARRIS, M. O.; APPEL, H. M.; SCHULTZ, J. C.; PEREIRA, M. H.; GIRON, D. Shared weapons of blood- and plant-feeding insects: Surprising commonalities for manipulating hosts. *Journal of Insect Physiology*, v. 84, p. 4–21, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.12.006>
- GUO, H.; SONG, X.; WANG, G.; YANG, K.; WANG, Y.; NIU, L.; CHEN, X.; FANG, R. Plant-generated artificial small RNAs mediated aphid resistance. *PLoS ONE*, v. 9, e97410, 2014.
- HALL, D. G.; HENTZ, M. G. Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Liviidae) Tolerance to Heat. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 107, n. 3, p. 641–649, 2014.
- HALL, D. G.; RICHARDSON, M. L.; AMMAR, E. D.; HALBERT, S. E. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 146, n. 2, p. 207–223, 2013.
- HALL, D. G.; WENNINGER, E. J.; HENTZ, M. G. Temperature Studies with the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri*: Cold Hardiness and Temperature Thresholds for Oviposition. *Journal of insect science*, v. 11, p. 83, 2011.
- HATTORI, M.; KONISHI, H.; TAMURA, Y.; KONNO, K.; SOGAWA, K. Laccase-type phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *Journal of Insect Physiology*, v. 51, n. 12, p. 1359–1365, 2005.

- HENNE, W. M.; BUCHKOVICH, N. J.; EMR, S. D. The ESCRT Pathway. *Developmental Cell*, v. 21, n. 1, p. 77–91, 2011.
- HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *Journal of Insect Physiology*, v. 56, n. 3, p. 227–235, 2010.
- JAUBERT-POSSAMAI, S.; LE TRIONNAIRE, G.; BONHOMME, J.; CHRISTOPHIDES, G. K.; RISPE, C.; TAGU, D. Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *BMC biotechnology*, v. 7, p. 63, 2007.
- JOGA, M.R., ZOTTI, M.J., SMAGGHE, G., CHRISTIAENS, O. RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. *Front. Physiol.*, 17 November 2016 | <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00553>
- JAOUANNET, M.; RODRIGUEZ, A. A.; THORPE, P.; LENOIR, C. J. G.; MACLEOD, R.; ESCUDERO-MARTINEZ, C.; BOS, J. I. B. Plant immunity in plant–aphid interactions. *Front. Plant Sci.*, v. 5, n. 663, 2014. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00663>
- KILLINY, N.; HAJERI, S.; TIWARI, S.; GOWDA, S.; STELINSKI, L. L. Double-Stranded RNA Uptake through Topical Application, Mediates Silencing of Five CYP4 Genes and Suppresses Insecticide Resistance in *Diaphorina citri*. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, e110536. Doi:10.1371/journal.pone.0110536
- KOCI, J.; RAMASESHADRI, P.; BOLOGNESI, R.; SEGERS, G.; FLANNAGAN, R.; PARK, Y. Ultrastructural changes caused by Snf7 RNAi in larval enterocytes of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte). *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2014.
- LIU, Y. H.; TSAI, J. H. Effect of temperature on biology and life table parameters of Asian citrus psilid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Annals of Applied Biology*, v. 137, n. 3, p. 201–206, 2000.
- LIU, S.; DING, Z.; ZHANG, C.; YANG, B.; LIU, Z. Gene knockdown by intro-thoracic injection of double-stranded RNA in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40, p. 666–671, 2010. doi:10.1016/j.ibmb.2010.06.007
- LOPES, S.; FRARE, G.; BERTOLINI, E. Liberibacters Associated with Citrus Huanglongbing in Brazil: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Is Heat Tolerant, ‘*Ca. L. americanus*’ Is Heat Sensitive. *Plant Disease*, v. 93, n. 3, p. 5–10, 2009.
- MANN, R. S.; PELZ-STELINSKI, K.; HERMANN, S. L.; TIWARI, S.; STELINSKI, L. L. Sexual transmission of a plant pathogenic bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, between conspecific insect vectors during mating. *PLoS ONE*, v. 6, n. 12, 2011.
- MAO, Y.-B.; CAI, W.-J.; WANG, J.-W.; HONG, G.-J.; TAO, X.-Y.; WANG, L.-J.; HUANG, Y.-P.; CHEN, X.-Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, v. 25, n. 11, p. 1307–1313, 2007.
- MAO, J.; ZENG, F. Plant-mediated RNAi of a gap gene-enhanced tobacco tolerance against the *Myzus persicae*. *Transgen Res*, v. 23 p. 145–152, 2014.
- MOGILICHERLA, K.; HOWELL, J. L.; PALLI, S. R. Improving RNAi in the Brown Marmorated Stink Bug: Identification of target genes and reference genes for RT-qPCR. *Scientific Reports*, v. 8, p. 3720, 2018. doi:10.1038/s41598-018-22035-z
- PANDEY, P.; SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. Advances in Plant Gene Silencing Methods. *Methods in molecular biology*, v. 1287, p. 3–23, 2015.

- PARRA, J. R. P.; ALVES, G. R.; DINIZ, A. J. F.; VIEIRA, J. M. *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) x *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): mass rearing and potential use of parasitoid in Brazil. *Journal of Integrated Pest Management*, v. 7, p. 1-11, 2016.
- PARRA, J. R. P.; LOPES, J. R. S.; TORRES, M. L. G.; NAVA, D. E.; PAIVA, P. E. B. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao huanglongbing. *Citrus Research & Technology*, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2010.
- PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. D. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. D. Origem, classificação botânica e distribuição geográfica. In: CUNHA SOBRINHO, A. P. D.; MAGALHÃES, A. F. D. J.; SOUZA, A. D. S.; SOARES FILHO, W. D. S. (Ed.). *Cultura do citros*. v. 1 ed. Brasília: EMBRAPA, 2013. p. 15-23.
- PELHAM, H. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci.*, v. 15, n. 12, p. 483-486, 1990.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.
- PITINO, M.; COLEMAN, A. D.; MAFFEI, M. E.; RIDOUT, C. J.; HOGENHOUT, S. A. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS ONE*, v. 6, n. 10, p. 1-8, 2011.
- PRENTICE, K.; CHRISTIAENS, O.; PERTRY, I.; BAILEY, A.; NIBLETT, C.; GHISLAIN, M.; GHEYSEN, G.; SMAGGHE, G. RNAi-based gene silencing through dsRNA injection or ingestion against the African sweet potato weevil *Cylas puncticollis* (Coleoptera: Brentidae). *Pest. Manag. Sci.*, v. 73, p. 44-52, 2017. doi:10.1002/ps.4337
- RAMASESHADRI, P.; SEGERS, G.; FLANNAGAN, R.; WIGGINS, E.; CLINTON, W.; ILAGAN, O.; MCNULTY, B.; CLARK, T.; BOLOGNESI, R. Physiological and Cellular Responses Caused by RNAi- Mediated Suppression of Snf7 Orthologue in Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) Larvae. *PLoS ONE*, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2013.
- ROBERTS, R.; STEENKAMP, E. T.; PIETERSEN, G. Three novel lineages of “*Candidatus Liberibacter africanus*” associated with native rutaceous hosts of *Trioza erytreae* in South Africa. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 65, n. Pt 2, p. 723-31, 1 fev. 2015.
- RUSTEN, T. E.; STENMARK, H. How do ESCRT proteins control autophagy? *Journal of cell science*, v. 122, n. 13, p. 2179-2183, 2009.
- SANTOS-ORTEGA, Y.; KILLINY, N. Silencing of sucrose hydrolase causes nymph mortality and disturbs adult osmotic homeostasis in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 101, p. 131-143. 2018.
- SAURABH, S.; VIDYARTHI, A. S.; PRASAD, D. RNA interference: Concept to reality in crop improvement. *Planta*, v. 239, n. 3, p. 543-564, 2014.
- SHAKESBY, A.J.; WALLACE, I.S.; ISAACS, H.V.; PRITCHARD, J.; ROBERTS, D.M.; DOUGLAS, A.E. A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 39, p. 1-10, 2009. doi:10.1016/j.ibmb.2008.08.008
- SHARMA, A.; KHAN, A. N.; SUBRAHMANYAM, S.; RAMAN, A.; TAYLOR, G. S.; FLETCHER, M. J. Salivary proteins of plant-feeding hemipteroids - implication in phytophagy. *Bulletin of entomological research*, v. 104, n. 2, p. 117-36, 2014.
- SHUKLA, J. N.; KALSI, M.; SETHI, A.; NARVA, K. E.; FISHILEVICH, E.; SINGH, S.; MOGILICHERLA, K.; PALLI, S. R. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. *RNA biology*, v. 13, n. 7, p. 656-69. 2016.

- SOGAWA, K. Studies of the salivary glands of rice leafhoppers. III. Salivary phenolase. *Appl. Entomol. Zool.*, v. 3, p. 13–25, 1968.
- TANING, C. N. T.; ANDRADE, E. C.; HUNTER, W. B.; CHRISTIAENS, O.; SMAGGHE, G. Asian Citrus Psyllid RNAi Pathway – RNAi evidence. *Scientific Reports*, v. 6, p. 38082, 2016.
- TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD-JAGOUÉIX, S.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, v. 22, n. 3, p. 139–150, 2008.
- THAKUR, N.; UPADHYAY, S. K.; VERMA, P. C.; CHANDRASHEKAR, K.; TULI, R.; SINGH, P. K. Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase a gene. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, p. 1–9, 2014.
- TIWARI, S.; MANN, R. S.; ROGERS, M. E.; STELINSKI, L. L. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. *Pest. Manag. Sci.*, v. 67, p. 1258–1268. 2011. doi:10.1002/ps.2181
- WANG, N.; TRIVEDI, P. Citrus huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. *Phytopathology*, v. 103, n. 7, p. 652–65, 2013.
- WATANABE, D.; YAMADA, K.; NISHINA, Y.; TAJIMA, Y.; KOSHIMIZU, U.; NAGATA, A.; NISHIMUNE, Y. Molecular cloning of a novel Ca(2+)-binding protein (calmegin) specifically expressed during male meiotic germ cell development. *J. Biol. Chem.*, v. 269, n. 10, p. 7744–7749, 1994.
- WILL, T.; VAN BEL, A. J. E. Physical and chemical interactions between aphids and plants, *Journal of Experimental Botany*, v. 57, n. 4, p. 729–737, 2006. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj089>
- WU, F.; CEN, Y.; DENG, X.; CHEN, J.; XIA, Y.; LIANG, G. Movement of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) Adults between Huanglongbing-Infected and Healthy Citrus. *Florida Entomologist*, v. 98, n. 2, p. 410–416, 2015.
- XU, L. J.; DUAN, X. L.; LV, Y. H.; ZHANG, X. H.; NIE, Z. S.; XIE, C. J.; NI, Z.; LIANG, R. Silencing of an aphid carboxylesterase gene by use of plant-mediated RNAi impairs *Sitobion avenae* tolerance of Phoxim insecticides. *Transgen Res*, v. 23, p. 389–396, 2014.
- YE, Y.-X.; PAN, P.-L.; KANG, D.; LU, J.-B.; ZHANG, C.-X. The multicopper oxidase gene family in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 63, p. 124–132, ago. 2015.
- YU, X.; GOWDA, S.; KILLINY, N. Double-stranded RNA delivery through soaking mediates silencing of the muscle protein 20 and increases mortality to the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Pest. Manag. Sci.*, v. 73, p. 1846–1853. 2017. doi:10.1002/ps.4549
- YU, X.; LIU, Z.; HUANG, S.; CHEN, Z.; SUN, Y.; DUAN, P.; MA, Y.; XIA, L. RNAi-mediated plant protection against aphids. *Pest. Manag. Sci.*, v. 72, p. 1090–1098. 2016. doi:10.1002/ps.4258
- ZHANG, Y.; FAN, J.; FRANCIS, F.; CHEN, J. Molecular characterization and gene silencing of Laccase 1 in the grain aphid, *Sitobion avenae*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. e21446. 2018.