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

**Genes de referência de *Diaphorina citri* para estudos de expressão gênica
quantitativa e seu controle por RNAi em laranja doce**

Meire Menezes Bassan

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

**Piracicaba
2017**

Meire Menezes Bassan
Engenheira Agrônoma

**Genes de referência de *Diaphorina citri* para estudos de expressão gênica
quantitativa e seu controle por RNAi em laranja doce**

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

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

Piracicaba
2017

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

Bassan, Meire Menezes

Genes de referência de *Diaphorina citri* para estudos de expressão gênica quantitativa e seu controle por RNAi em laranja doce / Meire Menezes Bassan. - - Piracicaba, 2017.

92 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. *Citrus sinensis* 2. Gene de referência 3. *Huanglongbing* 4. Silenciamento gênico
I. Título

DEDICATÓRIA

Ao meu amado esposo

Murilo de Freitas Mancuso

Pelo carinho, companheirismo, compreensão e amizade

Ao meu querido e amado filho

Pedro Bassan Mancuso

Pela paciência, pelo sorriso de todos os dias e pelo amor incondicional

Aos meus amados pais

Gilberto Antonio Bassan e Neide Menezes Bassan

Pelo incentivo, dedicação, valores ensinados e por nunca me deixarem desistir

É graças a vocês que hoje conquisto mais esse sonho....

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida maravilhosa, luz, auxílio, oportunidade de crescimento e pelo amparo nos momentos difíceis.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela infraestrutura, ensino, apoio e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Francisco de Assis Alves Mourão Filho por esses 10 anos de orientação e amizade. Obrigada pelos conselhos, compreensão, apoio em todos os momentos de dificuldade e pelo seu exemplo de caráter, honestidade e profissionalismo.

Aos Professores Doutores Pedro Yamamoto, João Roberto Spotti Lopes e Hilton Thadeu Zarate Couto pela orientação, oportunidade, amizade e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Doutora Simone Rodrigues da Silva, pela oportunidade de crescimento profissional, conselhos e valiosa amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado e recursos para auxílio à pesquisa, destinados à realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos Gustavo Rodrigues Alves e Jéssika Angelotti Mendonça, vocês foram verdadeiros anjos que Deus colocou em minha vida para que eu pudesse realizar este trabalho. Muito obrigada pela ajuda profissional e pessoal, pelos dias e noites, sábados e domingos, Carnaval, Natal e Ano Novo em que ficaram até tarde comigo avaliando experimento. Obrigada pela valiosa amizade e por terem enfrentado junto comigo todas as dificuldades que apareceram. Não teria conseguido sem vocês!!! “Vamos na fé, que no fim tudo dá certo”.

Ao meu amigo e estagiário Fredericko Baraldi que me acompanhou desde o início desde trabalho e sempre esteve disposto a ajudar, aprender e me ensinar.

Às minhas queridas amigas e companheiras de jornada acadêmica Lígia e Tati que sempre estiveram presentes dividindo as alegrias, dificuldades e ensinamentos durante todo o trabalho. Obrigada por estarem por perto sempre que precisei de vocês!!!

A todos os meus amigos do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, do CENA e do Departamento de Entomologia Arthur, Juliana, Rafael, Tati, Perla, Renata, Marcelo, Eveline e Lili pela convivência, apoio, pelas risadas e momentos de distração, principalmente quando nada dava certo.

Ao técnico agrícola Éder Cintra por esses 11 anos de amizade, ensinamentos e ajuda no desenvolvimentos dos trabalhos. Você sempre esteve pronto para me ajudar e tornou os trabalhos mais fáceis e divertidos.

Ao Professor Doutor Dirceu Brasil Viera que, na condição de Diretor de Extensão Rural da Prefeitura Municipal de Limeira, me permitiu desenvolver este trabalho, enquanto funcionária da Secretaria de Desenvolvimento Rural e Meio Ambiente. Obrigada pela amizade, confiança, conselhos e apoio.

Às minhas amigas da Secretaria de Desenvolvimento Rural e Meio Ambiente Raquel, Ariane, Meirielen e Patrícia. Vocês acompanharam minhas dificuldades diariamente e sempre estiveram lá para me escutar, amparar e compartilhar as risadas de cada dia.

Aos meus amigos da União Espírita de Piracicaba, aqui representados por Sérgio Aguiar, Alba, Carlos, Nairzinha, Jannayna, Luísa, Tatiane e meus queridos alunos da Evangelização Infantil. Vocês foram a luz guia e a energia que mantiveram meu espírito forte para conseguir vencer todas as dificuldades com serenidade e equilíbrio. Vocês me ensinam e me ajudam a ser uma pessoa melhor.

Às minhas queridas amigas da República Txé-K Jaqueline, Paula e Marcela pela eterna amizade. Mesmo a distância vocês sempre se fizeram presentes em minha vida.

À secretária do PPG em Fitotecnia Luciane Aparecida Lopes Toledo pela atenção, prontidão, amizade e pelas agradáveis conversas.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal, em especial ao Aparecido, Cleusa, Edileusa, Bete, Célia e Paulo pelo “Bom dia!” diário e pelo auxílio nos mais variados momentos.

A todos meus queridos amigos e familiares que estiveram presentes em minha vida durante a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

EPIÍGRAFE

*Nos momentos de crise, não te abates. Escuta;
Por nada te revoltas, nem te amendrontes. Ora;
Suporta a provação, não reclames. Aceita;
Não grites com ninguém, nem firas. Abençoa;
Lance de sofrimento, é o ensejo da fé. Silencia
Deus sabe o instante de intervir.*

Francisco Cândido Xavier

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
REFERÊNCIAS	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. CITROS: ASPECTOS GERAIS	15
2.2. HUANGLONGBING	17
2.3. <i>DIAPHORINA CITRI</i> KUWAYAMA	19
2.4. GENES DE REFERÊNCIA EM ANÁLISES DE RT-QPCR	21
2.5. SILENCIAMENTO GÊNICO POR INTERFERÊNCIA DE RNA (RNAi)	23
2.6. V-ATPASE	28
REFERÊNCIAS	30
3. SELEÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA QUANTITATIVA EM <i>DIAPHORINA CITRI</i>	41
Resumo	41
Abstract	41
3.1. INTRODUÇÃO	42
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.3. RESULTADOS	47
3.4. DISCUSSÃO	55
REFERÊNCIAS	58
4. CONTROLE DE <i>DIAPHORINA CITRI</i> POR RNAi EM LARANJA DOCE EXPRESSANDO RNA DE FITA DUPLA DO GENE <i>V-ATPASE-A</i>	62
Resumo	62
Abstract	62
4.1. INTRODUÇÃO	63
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	66
4.3. RESULTADOS	72
4.4. DISCUSSÃO	77
REFERÊNCIAS	83
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	91

RESUMO

Genes de referência de *Diaphorina citri* para estudos de expressão gênica quantitativa e seu controle por RNAi em laranja doce

O HLB tem sido uma das principais doenças responsáveis pelos prejuízos econômicos enfrentados na citricultura mundial. Essa doença é associada a três espécies de bactérias de colonização restrita ao floema das plantas, as quais são transmitidas pelo psíldeo *Diaphorina citri*. Uma vez que não há medidas curativas para a doença, o manejo baseia-se em medidas preventivas incluindo o controle do inseto vetor. O silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi) é uma nova ferramenta biotecnológica no controle de pragas, pois, proporciona uma ação eficiente e gene-espécie específica. Entretanto, essa tecnologia depende de análises de expressão gênica com genes de referência adequados e estáveis. Este trabalho buscou selecionar e validar a estabilidade da expressão de seis genes de referência potenciais de *D. citri* sob diferentes condições experimentais e avaliar a biologia deste inseto em plantas transgênicas de laranja doce expressando dsRNA do gene *DcV-ATPase-A* visando o seu controle. Para isso, foram avaliados: 1) a estabilidade de seis genes candidatos a referência: *fator de alongação 1alfa (EF 1-α)*, *actina (ACT)*, *gliceradeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)*, *proteína ribossomal L7 (RPL7)*, *proteína ribossomal L17 (RPL17)* e *alfa tubulina (TUB)*, através de diferentes algoritmos matemáticos: Delta Ct, NormFinder, BestKeeper e Genorm em cinco estádios de desenvolvimento (Ninfas de 1º e 2º ínstar; Ninfa de 3º ínstar; Ninfas de 4º e 5º ínstar, Adulto de 1 dia; Adulto de 10 dias) e dois hospedeiros (*Citrus sinensis* e *Murraya paniculata*). O ranqueamento final dos genes foi obtido através do RefFinder e a validação dos mesmos através do gene *V-ATPase-A*; 2) a sobrevivência de psíldeos adultos alimentados em plantas transgênicas; a biologia da *D. citri* em plantas transgênicas expressando o dsRNA do gene *DcV-ATPase-A*; e a expressão relativa deste gene. Recomenda-se a utilização de dois genes de referência quando consideram-se diferentes hospedeiros e fases de desenvolvimento distintas. Para análise de expressão gênica, independentemente da fase de desenvolvimento do inseto, quando utiliza-se *M. paniculata* como hospedeiro de criação, recomenda-se a utilização dos genes *GAPDH* e *RPL7*, enquanto que para *C. sinensis* sugerem-se os genes *GAPDH* e *EF 1-α*. Os bioensaios demonstraram a internalização pelo inseto das moléculas de dsRNA/siRNA produzidas pelas plantas transgênicas e o potencial de redução da expressão do gene alvo pelo RNAi. Apesar da ausência de fenótipo letal em psíldeos adultos alimentados nas plantas transgênicas, alterações significativas na duração, sobrevivência e longevidade foram verificadas em *D. citri* quando esta desenvolveu seu ciclo biológico nas plantas que expressam dsRNA do gene *DcVATPase-A*.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*; Gene de referência; *Huanglongbing*; Silenciamento gênico

ABSTRACT

***Diaphorina citri* reference genes for quantitative gene expression studies and their control by RNAi in sweet orange**

HLB has been one of the main diseases responsible for the economic losses faced in the citriculture worldwide. This disease is associated to three species of colonization bacteria restricted to the phloem of the plants, which are transmitted by the psyllid *Diaphorina citri*. Since there are no curative methods for the disease, management is based on preventive methods including vector insect control. Gene silencing by RNA interference (RNAi) has been presented as a new biotechnological tool in pest control, since it provides a efficient and specific gene-specie control. However, this technology depends on analyzes of gene expression with suitable and stable reference genes. Thus, this work aimed to select and validate the stability of the expression of six potential reference genes of *D. citri* under different experimental conditions and to evaluate the biology of this insect on sweet orange transgenic plants expressing dsRNA of *DcV-ATPase-A* gene aiming their control. In order to do this, it was evaluated: 1) the stability of six candidate reference genes: *elongation factor 1 alpha (EF 1-α)*, *actin (ACT)*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*, *ribosomal protein L7 (RPL7)*, *ribosomal protein L17 (RPL17)* e *alpha tubulin (TUB)*, through different mathematical algorithms: Delta Ct, NormFinder, BestKeeper and Genorm in five developmental stages and two hosts (*Citrus sinensis* and *Murraya paniculata*). The final rank was obtained through the RefFinder and validated by the *V-ATPase-A* gene; 2) the survival of adult psyllids fed on transgenic plants; the biology of *D. citri* in transgenic plants expressing dsRNA of the *DcV-ATPase-A* gene; and the relative expression of this gene. According to our results, two reference genes are recommended when different hosts and different developmental stages are considered. For gene expression analysis, regardless the insect developmental stage, when using *M. paniculata* as a breeding host, it is recommended to use *GAPDH* and *RPL7* genes, whereas for *C. sinensis* *GAPDH* and *EF 1-α* are indicated. The bioassays demonstrated the insect's internalization of the dsRNA / siRNA molecules produced by the transgenic plants and the potential for reducing the target gene expression by RNAi. Despite the absence of lethal phenotype in adult psyllids fed to transgenic plants, significant changes in duration, survival and longevity were observed for *D. citri* when it developed its biological cycle in plants that express dsRNA of the *DcVAPTase-A* gene.

Keywords: *Citrus sinensis*; Reference gene; *Huanglongbing*; Gene silencing

1. INTRODUÇÃO

A citricultura representa um importante segmento da agricultura brasileira. A partir da década de 80, o Brasil se consolidou como maior produtor mundial de laranja (FAO, 2016). A produção brasileira foi de 16 milhões de toneladas em 2015, o que corresponde a 24,51% do total de laranjas produzidas (FNP, 2016; FAO, 2016). A China é o segundo maior produtor de laranja, com 7 milhões de toneladas seguida pelos Estados Unidos da América com 5,7 milhões (FAO, 2016).

Entretanto, o aumento da incidência da doença huanglongbing (HLB) tem sido um dos principais responsáveis pelos prejuízos econômicos enfrentados pela citricultura brasileira. Essa doença tem ameaçado este importante setor do agronegócio devido aos danos que causa, à dificuldade de manejo, à sua rápida disseminação e por afetar praticamente todas as espécies e cultivares de citros (Bové, 2006). O HLB é associado a três espécies de bactérias de colonização restrita ao floema das plantas (Bové, 2006) denominadas *Candidatus Liberibacter* spp., as quais são transmitidas pelo psilídeo *Diaphorina citri*. Atualmente, estima-se que 16,9% das plantas cítricas do país encontram-se com sintomas do HLB (Fundecitrus, 2016).

As principais medidas de controle para o HLB são o controle do inseto vetor, eliminação de plantas sintomáticas e uso de mudas sadias (Belasque Junior et al., 2010; Lopes et al., 2009). Entretanto, tais medidas são onerosas e pouco eficazes. Segundo Bassanezi (2012), 44% dos citricultores têm optado por não eliminar as plantas doentes, logo, houve aumento do inóculo da bactéria nos pomares, dificultando o controle da doença.

Uma nova possibilidade para o manejo de pragas tem sido estudada através do silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi). Uma vez que esta ferramenta proporciona uma ação eficiente e gene-espécie específica, sua utilização no manejo de pragas pode ser uma alternativa de controle do HLB, com maior eficiência e menor impacto ambiental (Price; Gatehouse, 2008).

O sucesso na utilização do sistema de RNAi em insetos depende de um sistema adequado de fornecimento do RNA de dupla fita (dsRNA), pois, o processo de silenciamento gênico necessita da ação da molécula efetora dentro das células do organismo alvo. Dessa forma, métodos como injeção, alimentação, absorção e plantas transgênicas expressando um *hairpin* de um fragmento do gene a ser silenciado têm sido avaliados no fornecimento de dsRNA para insetos (Katoch et al., 2013).

Diversos trabalhos científicos têm obtido sucesso na utilização da técnica de interferência por RNA em muitas espécies, tanto com ensaios de alimentação artificial e microinjeção como na produção de plantas transgênicas, entre eles podem ser citados: *Bactericerca cockerelli* (Wuriyanghan et al., 2011); *Nilaparvata lugens* (Li et al., 2011); *Diaphorina citri* (El-Shesheny et al., 2013); *Diabrotica virgifera virgifera* (Baum et al., 2007; Mao et al., 2007); e *Bemisia tabaci* (Upadhyay et al., 2011; Thakur et al., 2014). Nestes estudos, não somente foram observadas alterações na sobrevivência do inseto, como também redução significativa da expressão relativa dos genes alvos silenciados.

Diante das dificuldades encontradas no melhoramento convencional de citros, da severidade do HLB, da ausência de medidas curativas e da dificuldade de controle do inseto vetor, a utilização do silenciamento gênico por RNAi apresenta-se como uma alternativa para o manejo adequado desta doença em citros. A avaliação de plantas transgênicas expressando dsRNA de genes essenciais à sobrevivência, reprodução, crescimento e alimentação de *D. citri* pode resultar em uma importante alternativa de manejo desta praga e, conseqüentemente, da doença. Entretanto, o desenvolvimento desta tecnologia depende de análises de expressão gênica para confirmação do silenciamento do gene alvo. Esta avaliação somente apresenta confiabilidade quando são utilizados genes de referência adequados e estáveis, uma vez estes são os responsáveis pela normalização dos níveis de RNAm entre as diferentes amostras. No entanto, o nível de expressão destes genes podem alterar entre tecidos ou células sob condições diferentes. Logo, a seleção de genes de referência é crítica para os estudos de expressão quantitativa dos genes (Kozera & Rapacz, 2013).

Este trabalho teve como objetivos selecionar e validar a estabilidade da expressão de seis genes de referência potenciais de *D. citri* sob diferentes condições experimentais e avaliar a biologia deste inseto em plantas transgênicas de laranja doce expressando ds-RNA do gene *DcV-ATPase-A* visando o seu controle.

Referências

- BAUM, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, New York, v.25, p.1322-1326, 2007.
- BASSANEZI, R.B. Manejo do Huanglongbing dos citros pela redução do inóculo e controle do vetor: dificuldades e avanços. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2012, Bento Gonçalves. **Anais eletrônicos...** Bento Gonçalves, 2012. Disponível em: <http://www.congressofruticultura2012.com.br/anais/programacao/textospaineis/Painel_8_Re_nato.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2014.
- BELASQUE JÚNIOR, J.; YAMAMOTO, P.T.; MIRANDA, M.P.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J.M. Controle do Huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, p.53-64, 2010.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.88, p.7-37, 2006.
- 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, 2013.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO **Agrianual 2016**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: Editora FNP, 2016. 456 p.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 10 Dez, 2016.
- FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/greening/10>>. Acesso em: 10 dez. 2016.
- KATOCH, R.; SETHI, A.; THAKUR, N.; MURDOCK, L.L. RNAi for insect control: current perspective and future challenges. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.171, p.847-873, 2013.
- KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**, v.54, p.391-406, 2013.
- LI, J.; CHEN, Q.; LIN, Y. JIANG, T.; WUA, G.; HUA, H. RNA interference in *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) based on dsRNA ingestion. **Pest Management Science** v.67, p.852-859, 2011.
- LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N.G.; AYRES, A.J.; MARIN, D.R.; BOVÉ, J.M. Liberibacters associated with citrus

huanglongbing in Brazil: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ is heat tolerant, ‘*Ca. L. americanus*’ is heat sensitive. **Plant Disease**, v.93, p.257-262, 2009.

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**, New York, v.25, p.1307-1313, 2007.

PRICE, D.R.G.; GATEHOUSE, J.A. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v.26, p.393-400, May 2008.

UPADHYAY, S.K.; CHANDRASHEKAR, K.; THAKUR, N.; VERMA, P.C.; BORGIO, J.F.; SINGH, P.K.; TULI, R. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.36, p.153-161, 2011.

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, 2014.

WURIYANGHAN, H.; ROSA, C.; FALK, B.W. Oral delivery of double-stranded RNAs and siRNAs induces RNAi effects in the potato/tomato psyllid, *Bactericerca cockerelli*. **Plos One**, v.6, 2011.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Citros: aspectos gerais

A provável origem das plantas cítricas são as regiões tropicais e subtropicais do sudeste asiático e do arquipélago Malaio com ramos filogenéticos que se estendem ao Japão, à Nova Guiné, Austrália e África Tropical (Swingle; Reece, 1967; Soost; Cameron, 1975; Nicolosi et al., 2000). O gênero *Citrus* abrange a maioria das plantas cítricas de interesse comercial e este pertence à família botânica Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citriae, subtribo Citrinae, a qual possui mais cinco gêneros: *Clymenia*, *Eremocitrus*, *Fortunella*, *Microcitrus* e *Poncirus* (Lu; Zhou; Xie, 2011).

Quando se trata de *Citrus* observa-se grande complexidade em sua classificação taxonômica, uma vez que diferentes sistemas têm sugerido um número variável de espécies, sendo descritas de 11 até 162 espécies distintas. Esta complexidade que envolve a filogenia e taxonomia do gênero *Citrus* pode ser parcialmente relacionada com características de sua biologia reprodutiva como grande intercompatibilidade sexual, apomixia e formação de embriões nucelares (Araújo; Roque, 2005). Entre os sistemas de classificação propostos, merecem destaque o formulado por Swingle e Reece (1967), em que foram reconhecidas 16 espécies como pertencentes ao gênero *Citrus* e o proposto por Tanaka (1977), no qual foram descritas 162 espécies para este mesmo gênero (Araújo; Roque, 2005).

Entretanto, a realização de estudos na área de morfologia e biologia molecular estabeleceu que o gênero *Citrus* é formado por apenas três espécies verdadeiras: cidra (*Citrus medica* L.), tangerina (*C. reticulata* Blanco) e toranja (*C. grandis* L.), e os demais representantes que haviam sido classificados como espécies, na verdade são híbridos (Barret; Rhodes, 1976; Moore, 2001). Essa classificação foi apoiada por estudos da Fração I das proteínas de folhas (Handa et al., 1886) e por trabalhos realizados com isoenzimas e marcadores moleculares (Green et al., 1986; Torres et al., 1978; Roose, 1988; Yamamoto et al., 1993; Coletta Filho et al., 1998).

Nos plantios comerciais, as frutas cítricas mais utilizadas como porta-enxertos são limão ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck), limão ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* V. Ten & Pasq.), tangerina ‘Sunki’ (*C. sunki* hort. ex Tanaka), tangerina ‘Cléopatra’ (*C. reshini* hort. ex Tanaka), laranja azeda (*C. aurantium* L.), trifoliata (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), híbridos citrange ‘Carrizo’ e citrange ‘Troyer’ [*C. sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e citrumelo ‘Swingle’ [*C. paradisi* Macfad. cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]

(Pompeu Junior, 2005). Quanto às copas, destacam-se as laranjas doces (*C. sinensis* (L.) Osbeck), tangerinas (*C. reticulata* Blanco), limões (*C. limon* (L.) Burm. F.), limas ácidas [*C. aurantifolia* (Christm.) Swing e *C. latifolia* (Yu. Tanaka)] e pomelos (*C. paradisi* Macfad) (Pio et al., 2005).

Entre as espécies copas citadas, destaca-se o grupo das laranjas doces, uma vez que estas representam aproximadamente dois terços dos plantios de citros nos países citrícolas (Pio et al., 2005). Acredita-se que a origem da laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) é a região da Indochina e sul da China, ao redor de 4.000 anos atrás. No Brasil, foi introduzida pelos portugueses, por volta de 1530 no início da colonização. Inicialmente, a citricultura desenvolveu-se mais nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia. O chamado Cinturão Citrícola engloba 20 municípios do Estado de São Paulo mais o Triângulo Mineiro (Neves et al., 2010), sendo as cultivares ‘Pêra’, ‘Valência’, ‘Natal’, e ‘Hamlin’, as principais laranjas doces cultivadas (Coordenadoria de Defesa Agropecuária, 2016).

A produção brasileira de laranja ocupa uma área de 683 mil hectares, sendo que 70% destas áreas são representadas por pomares paulistas, os quais contribuem com 78% da produção nacional e geram 150 mil postos de trabalho (diretos e indiretos). Além de maior produtor de laranja, o Brasil também é o maior produtor e exportador de suco de laranja. Na safra 2014/15, até o mês de agosto, foram produzidas 935 mil toneladas métricas de suco de laranja, das quais 98% foram exportados (FNP, 2016).

A agroindústria citrícola brasileira movimentava anualmente cerca de R\$ 47,5 bilhões e gera R\$ 613 milhões de impostos para o país (Fundecitrus, 2016). O Brasil é responsável por 54% da produção mundial de suco de laranja, sendo que o Estado de São Paulo produz 53% deste total. A exportação do suco de laranja traz para o país de US\$ 1,5 a 2,5 bilhões por ano, sendo que o principal destino do suco brasileiro é a Bélgica, Países Baixos e Estados Unidos da América (FNP, 2016).

A cultura dos citros tem sido alvo constante de inúmeras pragas e doenças que têm prejudicado a produtividade e a qualidade das frutas cítricas. Desde o final da década de 80 e início do século XXI, a acentuada incidência de doenças como a clorose variegada dos citros (CVC), cancro cítrico, morte súbita dos citros (MSC) e huanglongbing (HLB) ou greening têm causado alterações no perfil da citricultura brasileira (Neves; Lopes, 2005). Em 2015, o Brasil apresentou uma redução de 3,6 milhões de toneladas de laranjas produzidas em relação a 2011 (FNP, 2016), sendo o HLB um dos principais responsáveis pelos prejuízos econômicos enfrentados pelos citricultores. Desde 2004, foram eliminadas 44 milhões de plantas por causa desta doença o que têm levado à uma redução do número de pequenos

citricultores (até 20 mil plantas) e a um aumento de plantas em pomares de grandes produtores (mais de 100 mil plantas) (Coordenadoria de Defesa Agropecuária, 2016; CONAB, 2013).

2.2. Huanglongbing

Huanglongbing significa em chinês “doença do ramo amarelo”. Relatado primeiramente no sul da China, em 1919, esta doença já se encontra disseminada no cinco continentes. Na América, a primeira detecção foi no Brasil, em 2004 na cidade de Araraquara, interior do Estado de São Paulo e no ano seguinte, o HLB foi detectado no sul da Flórida, a segunda maior região produtora mundial de laranja doce (Colleta-Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005; Gottwald, 2010). Esta doença se espalhou rapidamente em ambos países, causando perdas econômicas significativas. Também foi identificada em pomares na Argentina, Paraguai (Lopes et al., 2013), Cuba (Luis et al., 2009), Jamaica (Oberhein et al., 2011), Belize (Manjunath et al., 2010) e México (Trujillo-Arriga et al., 2010).

Plantas infectadas com esta doença são caracterizadas, inicialmente, pela presença de um ou poucos ramos com folhas que perdem parte da sua coloração verde, apresentando-se parcialmente amarelas e verdes, sem uma delimitação clara entre as duas cores, em poucas plantas no pomar. Esse sintoma é denominado “mosqueado”. Além disso, também pode ser observado assimetria dessas regiões verdes e amarelas, comparando-se os dois lados opostos do limbo foliar, delimitados pela nervura central (Bové, 2006). Folhas de ramos sintomáticos podem apresentar-se curvadas, tamanho reduzido, nervuras mais grossas e escurecidas, sendo que em estádios mais avançados da doença podem ocorrer desfolha e morte de ponteiros. Os frutos de ramos sintomáticos apresentam redução no tamanho, assimetria, e maturação incompleta com a região estilar mantendo-se verde. Cortes perpendiculares ao eixo desses frutos permitem observar a assimetria dos mesmos e também sementes abortadas e vasos alaranjados (Belasque Junior et al., 2009). A qualidade interna dos frutos também é afetada. Geralmente, frutos sintomáticos são menores, mais ácidos e com valores menores de sólidos solúveis, ratio e porcentagem de suco (Bassanezi, et al., 2006).

Avaliações anatômicas mostraram que a clorose localizada que ocorre nas folhas sintomáticas está relacionada com o bloqueio dos vasos do floema devido a deposição de calose e proteína P, que impedem o transporte de fotoassimilados para órgãos drenos como flor, frutos, folhas jovens e sistema radicular. Essa interrupção do fluxo de fotoassimilados causa o acúmulo de amido nos cloroplastos o que leva à ruptura interna da grana, danificando

o aparato fotossintético. Além disso, o sequestro de carbono pelas folhas causa a deficiência do mesmo na raiz, levando a planta ao declínio (Achor et al., 2010; Kim et al., 2009).

Apesar de não provocar a morte das plantas, com o passar dos anos, o HLB faz com que estas fiquem debilitadas e improdutivas, podendo chegar a redução de até 100% da produção, dependendo da proporção da copa afetada (Bassanezi, et al., 2006). Dados coletados em diferentes regiões citrícolas do mundo, inclusive em São Paulo, mostram que pomares afetados podem tornar-se totalmente inviáveis economicamente entre sete e dez anos após o aparecimento da primeira planta sintomática, caso medidas de controle não sejam adotadas. Para pomares jovens, de até quatro anos, o tempo de vida economicamente viável é de cinco anos (Gottwald et al., 2007).

Além dos sintomas descritos, estudos realizados na área molecular com expressão gênica e microarranjos mostraram que diversos genes de plantas infectadas com HLB têm sua expressão alterada, tanto de forma positiva como negativa. Os genes afetados estão envolvidos em diversas funções celulares, incluindo o metabolismo de carboidratos, biogênese da parede celular, respostas ao estresse biótico e abiótico, sinalização e fatores de transcrição, transporte, organização celular, modificação e degradação de proteínas, desenvolvimento, sinalização hormonal, tratamento de metal, biossíntese de metabólitos secundários e estresse oxidativo. Também foi observado que muitos desses genes são ortólogos de genes de *Arabidopsis thaliana* (Aritua et al., 2013; Mafra et al., 2013).

Sabe-se que mais de uma espécie de bactéria pode ser associada ao HLB, sendo que estas são procariotos Gram negativos pertencentes a família Rhizobiaceae e de colonização restrita ao floema das plantas (Bové, 2006). Devido ao fato dessas bactérias ainda não terem sido cultivadas em meio de cultura artificial, têm-se a designação de *Candidatus* como uma condição de candidato a ter aquela classificação (Machado et al., 2010). As três espécies de bactérias conhecidas e associadas ao HLB foram nomeadas de acordo com o continente em que foram primeiramente identificadas, sendo elas: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) e *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam), sendo a última encontrada somente no Brasil (Lopes et al., 2009). O tipo asiático está presente, além da Ásia, no Brasil, na Flórida e em Cuba (Martínez et al., 2009). No estado de São Paulo, o HLB é causado pelas bactérias CLas e CLam (Fundecitrus, 2016). Entretanto, a maior disseminação da doença nos pomares paulistas se deu pela CLas, uma vez que esta espécie apresenta maior tolerância a altas temperaturas e maior titulação em plantas de laranja doce infectadas com a doença (Lopes et al., 2009).

As três espécies de bactérias são transmitidas por insetos vetores (psílídeos) (Jagoueix; Bové; Garnier, 1994). No continente africano, o inseto vetor do HLB é o psílídeo *Trioza erythrae*. Este é sensível ao calor, desenvolvendo-se entre temperaturas de 22-25°C, enquanto que *D. citri* apresenta maior tolerância a temperaturas elevadas, sobrevivendo acima de 30°C (Bové; Garnier, 2003). Nos países asiáticos e americanos é o psílídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) que está associado à transmissão das bactérias CLas e Clam. Este inseto foi identificado no Brasil em 1942 (Costa-Lima, 1942), sendo considerado uma praga secundária para a citricultura até a constatação do HLB em 2004, quando passou a ser uma praga-chave na cultura do citros (Parra et al., 2010).

Uma vez que ainda não foram desenvolvidos métodos curativos para o HLB, a prevenção da infecção das plantas tem sido fundamental no controle da doença em pomares comerciais. Dessa forma, citricultores têm realizado o plantio de mudas saudáveis, o controle do inseto vetor e a eliminação de plantas doentes, como medidas preventivas. Também tem sido recomendada a eliminação das plantas de murta-de-cheiro ou falsa-murta (*Murraya paniculata*), independentemente de estarem infectadas ou de sua localização. Entretanto, o sucesso no controle do HLB através destas medidas depende da adoção das mesmas em escala regional e de forma contínua, além de exigir tempo, recursos humanos e financeiros (Belasque Junior et al., 2010).

2.3. *Diaphorina citri* Kuwayama

O psílídeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) é um inseto cosmopolita, originário da Ásia (Halbert; Nuñez, 2004). No patossistema do HLB, *D. citri* assume uma posição proeminente como vetor porque é abundante na maior parte das regiões onde a doença é endêmica, e transmite diferentes bactérias associadas ao HLB (Capoor et al., 1972; Yamamoto et al., 2006).

Os psílídeos adultos medem aproximadamente de 2,8 a 3,2 mm de comprimento, e quando jovens, apresentam coloração marrom claro, tornando-se escuros com o passar do tempo. As formas jovens apresentam cinco ínstaras ninfais, são praticamente imóveis, permanecendo aderidas à planta e secretam uma substância semelhante ao “honeydew”, o que permite o desenvolvimento da fumagina (Gomez-Torres, 2009). Em relação à alimentação, ninfas e adultos preferem brotações novas, porém na falta destas, utilizam folhas maduras, sendo que, a disponibilidade de brotações é um fator limitante na oviposição, uma vez que fêmeas adultas dessa espécie só colocam ovos em brotações (Parra, et al., 2010). Hospedam-

se em todas as variedades cítricas e na murta-de-cheiro ou falsa murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack], a qual é considerada planta hospedeira preferencial de *D. citri* (Halbert; Manjunath, 2004) e muito difundida no Brasil na utilização como cerva viva.

A duração do ciclo biológico de *D. citri* varia de acordo com a temperatura, assim como ocorre em outros insetos. Trabalhos realizados com este psílídeo têm indicado que a duração da fase ninfal variou de 10,6 a 39,6 dias e o ciclo biológico de 14,4 a 49,3 dias, de acordo com a temperatura em uma faixa de 28°C a 15°C, respectivamente; nas temperaturas de 10°C e 33°C não houve desenvolvimento do inseto. As temperaturas na faixa de 25° a 28°C são as mais adequadas ao desenvolvimento deste psílídeo (Liu; Tsai, 2000). Neste mesmo trabalho, os autores observaram que a temperatura também afeta a oviposição, uma vez que a média de ovos produzida por fêmeas aumentou com o acréscimo de temperatura, atingindo um total de 748,3 ovos a 28°C. Para esta mesma temperatura, também foi relatada maior viabilidade dos ovos (96,2%).

Os mecanismos de transmissão das bactérias associadas ao HLB pelo psílídeo ainda estão pouco elucidados. Acredita-se que a transmissão de *Candidatus Liberibacter* spp. por psílídeos siga o modelo de circulação e/ou propagação em vários tecidos do corpo do inseto, culminando com a inoculação via saliva, o que caracteriza a transmissão persistente propagativa (Parra et al., 2010). Trabalho realizado por Ammar et al. (2011) mostrou que a bactéria pode ser encontrada em vários órgãos internos de *D. citri* em diferentes concentrações, sendo que nas glândulas salivares observou-se concentrações bacterianas de 47 a 70% e no canal alimentar o título da bactéria alcançou os 80%. O vetor só transmite a bactéria para a planta hospedeira após esta atingir e multiplicar-se na glândula salivar do inseto vetor, uma vez que a saliva é necessária para a lubrificação do aparelho bucal do inseto durante a absorção da seiva floemática (Bové et al., 2003). Quanto à transmissão transovariana do patógeno, Pelz-Stelinski et al. (2010) mostraram que a taxa é de apenas 2 a 6%. A transmissão de CLas de machos infectados para fêmeas sadias durante a cópula (transmissão horizontal) também ocorre porém, a taxa é de apenas 4% (Mann et al., 2011). Os autores deste trabalho relatam ainda que a bactéria persiste nos órgãos reprodutivos, evidenciando que pode ocorrer propagação de população de CLas dentro da *D. citri*, mesmo na ausência de plantas hospedeiras infectadas. Esses resultados foram confirmados por Lee et al. (2015) em trabalho realizado com psílídeos infectados que foram colocados em plantas sadias de citros por 15 dias e depois retirados, deixando-se somente as ninfas orinunadas da progênie. Após 30 dias, esses insetos foram retirados das plantas e observou-se que de 5-83%

dos mesmos estavam infetados assim como as plantas que estes colonizaram apresentaram sintomas de HLB.

Ninfas de *D. citri* podem adquirir CLas e Clam a partir do 2º instar. Entretanto, somente ninfas de 4º e 5º ínstaes e adultos são capazes de transmiti-la. O período de alimentação para que o psílídeo possa transmitir a bactéria é variável, sendo que 15 minutos são considerados suficientes para infectar uma planta sadia, porém com baixa taxa de infecção. Com uma hora ou mais de alimentação, esta taxa é de 100% (Cappor; Rao; Viswanath, 1974; Mead; Fasulo, 2011). Trabalhos têm mostrado que há um aumento na concentração de bactérias no corpo do inseto em função do período de acesso à aquisição (Inoue et al., 2009; Pelz-Stelinski et al., 2010). Inoue et al., (2009) verificaram que, quando adquirida na fase adulta, não ocorreu aumento significativo na concentração da bactéria, porém, com a aquisição na fase ninfal (ninfas de 5º instar), foi observado um aumento de até 360 vezes na concentração da bactéria, fazendo com que estas ninfas se tornassem adultos altamente infectivos. Trabalho realizado em laboratório mostrou que após 5 semanas de alimentação a aquisição da bactéria pelas ninfas variou de 60 a 100%, sendo que para os adultos este valor não ultrapassou os 40% (Pelz-Stelinski et al., 2010).

Apesar da realização de diversos estudos que visem o desenvolvimento de métodos controle de *D. citri*, até o momento, o uso de inseticidas constitui a principal medida utilizada pelos produtores. Entretanto, este método traz diversas preocupações como o desenvolvimento de resistência à molécula do inseticida, (Marutani-Hert et al., 2009) e implicações ambientais e econômicas devido ao uso indiscriminado destes insumos nos pomares (Stuchi; Girardi, 2010).

Considerando a severidade do HLB, a ausência de medidas curativas e de cultivares de citros resistentes, as dificuldades encontradas no controle da bactéria devido à falta de sucesso nos trabalhos de cultivo *in vitro* de *Candidatus Liberibacter* spp. e a ameaça que esta doença apresenta a este importante setor econômico da agricultura mundial, métodos alternativos de controle do psílídeo representam uma importante estratégia no manejo do HLB.

2.4. Genes de referência em análises de RT-qPCR

A Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa (RT-qPCR) é considerada o método mais sensível, confiável e reproduzível para medir os níveis de transcrição de mRNA. Devido à sua precisão, essa técnica também é utilizada para validar dados obtidos por outros métodos,

tais como microarranjos (Gachon et al., 2004). O RT-qPCR é capaz de coletar dados ao longo da reação de PCR, combinando amplificação e detecção em um único passo, através de um repórter de fluorescência que correlaciona a concentração do produto de PCR com a intensidade de fluorescência (Higuchi et al., 1993). Os principais benefícios da técnica são: produção de dados quantitativos com um intervalo dinâmico e preciso; não requer manipulação pós-amplificação; é capaz de detectar de forma confiável uma única cópia de um transcrito específico e diferenças de expressão gênica tão pequenas quanto 23% entre as amostras e necessita de muito menos RNA modelo que outros métodos de análise de expressão gênica (Wong; Medrano, 2005). Entretanto, essa técnica requer equipamento e reagentes de alto custo e, devido à sua alta sensibilidade, é necessário introduzir métodos de normalização apropriados para validação dos resultados. Essa etapa é muito importante para reduzir a variabilidade experimental causada por fatores como quantidade inicial da amostra, integridade do mRNA e eficiência da transcrição reversa (Bustin et al., 2009; Wong e Medrano 2005).

Diante das diversas interferências que a análise de RT-qPCR pode sofrer, a normalização é um passo essencial para obtenção de resultados conclusivos. A utilização de genes de referência tem se mostrado como o método mais eficaz e um dos mais fáceis de corrigir os erros que podem ocorrer durante toda a pesquisa (Huggett et al., 2005). Entretanto, para obtenção de resultados precisos, seu uso requer a avaliação de uma variedade de genes relevantes, bem como sua posterior validação.

Genes de referência são definidos como um controle interno da reação de RT-qPCR que têm sequências diferentes do gene alvo (Kozera; Rapacz, 2013). Para que seja considerado um gene de referência estável, este deve atender a critérios importantes como: não ter seu nível de expressão afetado pelas condições experimentais, mostrar baixa variabilidade entre os tecidos e estados fisiológicos do organismo, ter um ciclo limiar semelhante com o gene de interesse e demonstrar a variabilidade resultante das imperfeições da tecnologia utilizada e dos procedimentos preparatórios (Chervonera et al., 2010; Kozera; Rapacz, 2013).

Os primeiros genes examinados como genes de referência foram os de metabolismo básico, também chamados de genes de manutenção. A transcrição destes ocorre em todos os tipos de células nucleadas e estão envolvidos em processos essenciais para a sobrevivência das células. Logo, considerava-se que estes genes seriam expressos em um nível constante (Thellin et al., 1999). Entretanto, diversos estudos têm demonstrado que tais genes de manutenção podem ser expressos diferencialmente, comprometendo assim a sua utilização

como padrões internos estáveis, pois muitos deles participam não apenas em processos metabólicos básicos. Dessa forma, o que pode parecer perfeito em uma determinada condição experimental não garante sua funcionalidade em outros experimentos (Ruan; Lai, 2007; Kozera; Rapacz, 2013).

Dessa forma, para obtenção de sucesso com a normalização, a estabilidade de expressão dos genes de referência deve ser validada em condições experimentais específicas. Recomenda-se também o uso de pelo menos dois genes de referência, para evitar a ocorrência de erros relativamente grandes, assim como aumentar a resolução e precisão dos resultados (Nicot et al., 2005). Em circunstâncias excepcionais, o uso de um único gene de referência é aceitável, se previamente avaliado em condições experimentais semelhantes e devidamente validado (Thellin et al., 1999). Para este objetivo, foram desenvolvidas abordagens estatísticas e algoritmos para determinar os genes mais adequados para normalização a partir de um painel de genes candidatos num dado conjunto de amostras biológicas, entre eles cita-se o geNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004), BestKeeper (Pfaffl et al., 2004), método comparativo delta Ct (Silver et al., 2006) e o software Refinder (Xie et al., 2011).

Entretanto, a análise de estabilidade de expressão dos genes candidatos podem variar dependendo do software utilizado (Lee et al., 2010), logo é aconselhável utilizar pelo menos um par de genes, responsáveis por funções distintas, assim como três diferentes programas de validação (Jacob et al., 2013) e tomar três amostras (réplicas biológicas) com três repetições para cada genótipo (Rapacz et al., 2012).

Diante do apresentado, enfatiza-se a necessidade de uma abordagem única para cada experimento e a validação de genes de referência candidatos, mesmo para estudos semelhantes aos anteriormente realizados. Estes devem ser utilizados somente como um ponto de partida para a seleção de genes de referência candidatos.

2.5. Silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi)

Uma das ferramentas biotecnológicas que tem aberto novas possibilidades no controle de pragas é o silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi). Uma vez que esta proporciona uma ação eficiente e gene-específica, sua utilização no manejo de pragas tem se tornado uma grande promessa de controle com alta eficiência e com um impacto ambiental inferior às técnicas antecessoras (Price; Gatehouse, 2008).

Este sistema baseia-se na supressão da expressão de genes através da introdução de RNA de cadeia dupla exógena (dsRNA) em células de organismos eucariotos, onde são clivadas em pequenos RNAs não codantes que atuam promovendo a degradação rápida do mRNA contendo a sequência homóloga ao dsRNA, levando ao silenciamento pós-transcricional do gene em questão (Mello; Conte, 2004; Fagard et al., 2000).

O processamento das moléculas de RNAi no citoplasma é catalizado por uma endonuclease do tipo RNase III, específica para dsRNA, denominada Dicer. Esta enzima associa-se ao dsRNA no citoplasma e o processa em fragmentos de cerca de 21-24 pares de base (Meister; Tulsch, 2004). Os pequenos RNAs gerados pela Dicer compreendem dois grupos (Ghildiyal; Zamore, 2009; Matranga; Zamore, 2007; Asgari, 2013): microRNAs (miRNAs), que são processados a partir de transcritos de genes endógenos e têm função na regulação da expressão gênica e pequenos RNAs de interferência (siRNAs), que são derivados de moléculas de dsRNA e proporcionam defesa contra vírus e elementos transponíveis. A utilização experimental de RNAi explora a via de siRNA. Estes são então incorporados num complexo ribonucleoproteico de silenciamento induzido por RNA (RISC - RNA-induced silencing complex) onde, o componente catalítico é um membro da família de proteínas chamada Argonauta, a qual apresenta um domínio de ligação ao RNA e um domínio de atividade nuclease (Carmell et al., 2002). Este complexo elimina uma das fitas do dsRNA (fita “Passageira”) e a fita remanescente guia o reconhecimento para degradação (ou inibição) da sequência específica do mRNA complementar (Martinez et al., 2002). A maioria dos eucariontes, incluindo animais e plantas, têm proteínas Dicer e Argonauta, e possuem a maquinaria de RNAi (Shabalina; Koonin, 2008).

Essa maquinaria de RNAi tem dois componentes principais: o componente do núcleo no interior das células, o qual é composto por enzimas Dicer, fatores de ligação a RNA e proteína Argonauta; e o componente sistêmico que amplifica o sinal de dsRNA e permite que espalhe para outros tecidos dentro do organismo (Siomi; Siomi, 2009). Esta amplificação do sinal de silenciamento, em plantas e no nematóide *Caenorhabditis elegans*, é conduzida pela enzima ‘RNA polimerase RNA-dependente’ (RdRP, do inglês “RNA-dependent RNA polymerase”). Os fragmentos do RNA fita simples (ssRNA) alvo liberado pela ação do complexo RISC servem como um molde para a síntese de dsRNA através da RdRP, dando origem a mais substrato para a degradação mediada por RISC do ssRNA alvo (Scott et al., 2013). RdRp foi identificada em algumas espécies animais para além dos nematóides *Caenorhabditis*, incluindo o cefalocordata *Branchiostoma floridae* (Vienne et al., 2003), mas até o momento, nenhum homólogo de RdRp foi verificado no genoma de qualquer inseto

sequenciado (Tomoyasu et al., 2008). Dessa forma, ainda não está claro se ou como o mecanismo de RNAi é desencadeado e sustentado em células de insetos, através da aquisição de moléculas de dsRNA.

O mecanismo de RNAi pode ser classificado em intracelular e extracelular. O primeiro envolve a expressão de *hairpins* RNAs em transgenes, introdução de dsRNAs em células através de transfecção ou eletroporação e por injeção diretamente na célula. No segundo, o dsRNA é entregue por imersão, alimentação, ou injeção no hemocelo. Neste último, é preciso que ocorra a absorção de moléculas de dsRNA pelas células (Yu et al., 2013). O sistema de RNAi tem sido ainda classificado em sistemas de células-autônomas, em que o processo de silenciamento é limitado à célula na qual o dsRNA é introduzido ou expresso; e células não-autônomas, que envolve um efeito RNAi em um local diferente da aplicação ou local de produção do dsRNA, e, portanto, acontece exclusivamente em organismos multicelulares (Grishok, 2005).

Em insetos, o sucesso na utilização do sistema de RNAi depende de uma maneira adequada de fornecimento de dsRNA, pois, o processo de silenciamento gênico necessita da ação da molécula efetora dentro das células do organismo alvo. Logo, o fator limitante para o sucesso da aplicação está vinculado a absorção deste RNA nas células-alvo e sua disseminação pelo organismo (Huvenne; Smaghe, 2010). Para que o sistema de silenciamento por RNAi ocorra de forma eficiente, é necessário que, após a ingestão do dsRNA pelo inseto através de alimentação, ocorra a absorção destas moléculas do lúmen intestinal, para dentro das células intestinais, a fim de silenciar o gene alvo. Os mecanismos de absorção de dsRNA exógenos pelo sistema digestivo de insetos ainda não estão totalmente elucidados. Entretanto, dois mecanismos potenciais para a absorção e transporte de dsRNA foram revelados em trabalhos realizados com *C. elegans* e *Drosophila melanogaster*, sendo eles os canais de proteínas transmembranas chamados de SID (Winston; Molodowitch; Hunter, 2002) e a absorção por endocitose (Ulvilla et al., 2006). Os principais métodos testados para fornecimento de dsRNA a insetos incluem a injeção, alimentação, absorção e plantas transgênicas expressando dsRNA (Katoch et al., 2013).

A maioria dos trabalhos publicados com silenciamento gênico para controle de pragas têm utilizado a introdução do dsRNA através de microinjeção no trato digestório e dietas artificiais. Apesar do sucesso obtido com essas técnicas para validação dos genes em espécies como *Bactericerca cockerelli* (Wuriyanghan et al., 2011); *Nilaparvata lugens* (Li et al., 2011); *Bemisia tabaci* (Upadhyay et al., 2011); *Spodoptera exigua* (Tian et al., 2009); *Bactrocera dorsalis* (Li; Zhang; Zhang, 2011); e *Diaphorina citri* (El-Shesheny et al., 2013),

apenas a transformação genética de plantas é realmente efetiva para o controle de pragas em condições de campo (Mao et al., 2007). Para que ocorra a ativação do mecanismo de RNAi, a planta transformada via *Agrobacterium tumefaciens* deve carregar vetores de expressão contendo sequências repetidas e invertidas do gene alvo do inseto, as quais formam RNA na forma de um *hairpin* quando transcritas, os quais são funcionalmente equivalentes a um dsRNA (Gu; Knipple, 2013).

O tamanho do fragmento de dsRNA influencia na absorção e na eficiência do silenciamento. Trabalhos realizados com fornecimento de dsRNA para afídeos através da alimentação obtiveram sucesso com sequências que variaram de 50 a 520 bp (Terenius et al., 2011; Huvenne, Smagghe, 2010; Saleh et al., 2006; Bolognesi et al., 2012; Scott et al., 2013). Entretanto, trabalho realizado com pequenos siRNA do gene *C002* por injeção em afídeos, demonstrou elevada eficiência na depleção da expressão deste gene de glândula salivar, o que resultou em alta mortalidade dos insetos (Mutti et al., 2006). Além do tamanho, a concentração de dsRNA também é muito importante para que se obtenham resultados satisfatórios na redução da expressão do gene (Yu et al., 2015).

Considerando que uma única troca de base pode resultar no não silenciamento do gene e que há evidências que secreções salivares e a hemolinfa dos afídeos podem degradar moléculas de dsRNA (Sapountziz et al., 2014; Christiaens et al., 2014), sugere-se que para obtenção de efeitos significativos de silenciamento por RNAi seja feita a administração de longos fragmentos de dsRNA em concentrações que atinjam um limiar que compense esse efeito degradatório (Yu et al., 2015).

Os primeiros trabalhos publicados utilizando a técnica do silenciamento gênico por RNAi no controle de pragas foram realizados por Baum et al. (2007) e Mao et al. (2007). No primeiro, os autores avaliaram larvas do coleóptero *Diabrotica virgifera virgifera*, importante praga do milho, quanto a ingestão de dsRNAs relativo a diversos genes e em distintas concentrações, em um ensaio de alimentação de 12 dias com dieta artificial. Em seguida, o gene que codifica a subunidade A da ATPase vacuolar foi escolhido para a transformação de plantas de milho expressando dsRNA homólogos ao gene e submetidas ao ataque de *Diabrotica virgifera virgifera*. Os resultados evidenciaram que, uma vez transformadas e expressando o dsRNA da ATPase, as plantas apresentaram níveis consideráveis de proteção quando comparadas com a planta controle (Baum et al., 2007). No trabalho de Mao et al. (2007), os autores demonstraram que ao se alimentar as larvas de *Helicoverpa armigera* com dieta artificial de plantas de tabaco e de *Arabidopsis* expressando o dsRNA do gene P450 monooxigenase, que confere a tolerância das larvas ao gossipol, foi observado uma redução

significativa na expressão deste gene. Quando essas larvas foram alimentadas em dieta contendo gossipol, foi observado um significativo retardamento do crescimento. Em trabalho seguinte, Mao et al. (2011) produziram plantas transgênicas de algodão expressando o dsRNA do gene de P450 monooxigenase, e estas plantas apresentaram uma maior resistência a *Helicoverpa armigera*, comprovando a eficiência da técnica.

Atualmente, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas visando o controle das principais pragas da agricultura através do RNAi. Estudo realizado com *Helicoverpa armigera* buscou otimizar as condições de silenciamento de genes baseados em RNAi em termos de locais de destino de dsRNA, tamanhos e doses de dsRNA nesta lagarta. Os resultados mostraram que o local tem pouco efeito sobre a eficiência do silenciamento induzido por dsRNA desde que este esteja localizado na região de codificação; que o tamanho do dsRNA deve estar acima de 25 pb; e que o fator mais importante para a maior eficiência de RNAi foi a concentração, sendo que não foi observado efeito de silenciamento se a quantidade de dsRNA era inferior a 0,425 ug/dia. Um aumento linear foi observado quando as doses de dsRNA aumentaram de 0,425 ug a 10,625 ug/dia e a saturação foi atingida com 53,125 ug/dia (Yang; Han, 2014).

Trabalho realizado por Hajeri et al. (2014) com *Citrus macrophylla*, *Citrus paradisi* e *Citrus aurantium* revelou que a técnica de RNAi também pode ser eficiente através do silenciamento gênico induzido por vírus (“virus-induced gene silencing” – VIGS) através da exploração do mecanismo de defesa antiviral das plantas hospedeiras (Waterhouse et al, 2001.; Lu et al., 2003). Os dsRNA intermediários gerados pela RNA polimerase viral durante a replicação são dirigidos para a maquinaria de defesa da planta (Waterhouse et al., 2001). Com a utilização de VIGS carregando sequências homólogas ao gene de interesse essa maquinaria de defesa é direcionada contra os mRNA correspondentes. Os autores deste trabalho demonstraram que o vírus da tristeza dos citros modificado com o gene *awd*, responsável pelo fenótipo da asa do *D. citri*, foi eficiente em promover alteração da expressão desse gene em insetos alimentados em plantas inoculadas com o vírus. Foi observado aumento na mortalidade e má formação na asa de psilídeos adultos. Além disso, os autores constataram que a indução do silenciamento gênico induzido por vírus pode ser transmitida através da enxertia.

2.6. V-ATPase

A utilização da técnica do RNAi em insetos com o silenciamento do gene de ATPases vacuolares ou V-ATPases tem sido bastante relatada em trabalhos científicos. Este complexo multienzimático é altamente conservado e distribuído entre diferentes organismos eucariontes. Estão presentes em compartimentos intracelulares de membranas como vacúolos, lisossomos, vesículas sinápticas, vesículas de reserva nutricional, glândulas secretoras e vesículas derivadas do complexo de Golgi. Atuam como bombas de prótons dirigidas por ATP, participando da acidificação de organelas celulares e transporte de prótons H^+ através de membranas plasmáticas (Allan et al., 2005; Cipriano et al., 2008). A acidificação de compartimentos celulares desempenha importante papel em processos celulares, incluindo endocitose mediada por receptor, direcionamento intracelular de enzimas lisossômicas recém sintetizadas, processamento e degradação de macromoléculas e acoplamento do transporte de pequenas moléculas (Beyenbach; Wiczorek, 2006). Nas membranas plasmáticas a hidrólise de ATP fornece a energia necessária para o transporte ativo de H^+ (regulação do pH), e o gradiente eletroquímico gerado dirige o transporte secundário de outros íons através de membranas plasmáticas (Cipriano et al., 2008).

Em insetos, as V-ATPases são encontradas nas membranas apicais de tecidos epiteliais, incluindo glândulas salivares, intestino médio e túbulos de Malpighi, onde participam da energização do transporte ativo secundário através destes epitélios (Allan et al., 2005). Identificada na membrana apical das células calciformes que revestem o intestino da lagarta do tabaco (*Manduca sexta*) a V-ATPase tem a função principal de criação de um potencial elétrico transmembrana, e não a criação de um gradiente de pH (Jefferies; Cipriano; Forgac, 2008). As células calciformes são responsáveis pela secreção de K^+ no intestino destes insetos através de duas proteínas de transporte, sendo a primeira a V-ATPase, que segrega prótons para o espaço luminal e, como consequência, cria um potencial positivo de membrana. A segunda é uma bomba eletrogênica do tipo antiporte ($K^+/2H^+$), que transporta dois prótons para dentro da célula calciforme, para cada K^+ transportado para o lúmen, utilizando, portanto, o potencial de membrana estabelecido pela V-ATPase para dirigir a secreção de K^+ . Essa estequiometria $K^+/2H^+$ torna o espaço luminal muito alcalino ($pH \approx 11$), ao contrário do trato digestivo da maioria das espécies de animais. Essa alcalinização pode estar envolvida com a degradação de metabólitos secundários, tais como taninos, os quais bloqueiam a absorção de nutrientes em insetos (Zhuang; Linser; Harvey, 1999; Wiczorek et al., 2009).

A V-ATPase é uma enzima de subunidades múltiplas, composta de dois domínios funcionais V1 e V0. O domínio periférico V1 está localizado no citoplasma, é composto de oito subunidades diferentes em uma estequiometria A₃B₃CDE₂FG₂H, e interage com ATP, ADP e Pi. Apresenta formato globular em anel em que as três subunidades A e B aparecem de forma alternada; no centro rotacional alongado estão presentes as cópias únicas das subunidades D e F; e possui uma região periférica alongada formada pelas subunidades C, E, G e H (Beyenbach; Wiczorek, 2006; Jefferies et al., 2008).

O domínio V0 está associado à membrana e é composto por seis subunidades com uma estequiometria de ac₄c'₂c''₂de, apresenta estrutura em anel, e é responsável pela translocação de prótons. O sítio catalítico para a hidrólise do ATP está presente na subunidade A do complexo V1 (Jefferies; Cipriano; Forgac, 2008). O modelo funcional mais amplamente aceito sugere que as V-ATPases apresentam uma região estática e outra móvel. A região móvel (ou rotor) é composta pelas subunidades D, F de V1, subunidade d e o anel de subunidades c de V0. As demais subunidades compõem a região estática (Beyenbach; Wiczorek, 2006).

A hidrólise do ATP pelo domínio V1 aciona a rotação do rotor composto por D, F, d, e subunidades proteolipídicas. A rotação do anel proteolipídico, ao passar pela subunidade A impulsiona o movimento dos prótons do citoplasma para o lado luminal da membrana (Jefferies; Cipriano; Forgac, 2008). A subunidade A mantém dois semi-canais de H⁺ próximos ao anel de subunidades c. Tais canais permitem o acesso de H⁺ citossólico aos seus sítios de ligação nas subunidades c que, após o ciclo de 360° do rotor, acessam agora o outro lado da membrana através do segundo semi-canal de H⁺ da subunidade A (Meier et al., 2005).

Diversos trabalhos científicos que visam o controle de insetos via RNAi de subunidades que compõem a V-ATPase têm sido desenvolvidos, além do realizado por Baum et al. (2007) com o silenciamento de *D. virgifera* através de dsRNA da V-ATPase A. Adultos da mosca branca (*Bemisia tabaci*) alimentados com dsRNA da subunidade A da V-ATPase apresentaram altas taxas de mortalidade, variando entre 70 a 97% (Upadhyay et al. 2011). Li et al. (2011) alimentaram larvas de *Nilaparvata lugens* com dsRNA homólogo à subunidade E da V-ATPase e observaram redução da transcrição do RNAm da subunidade E. Trabalho recente mostrou que adultos da mosca branca (*Bemisia tabaci*) alimentados em plantas transgênicas de tabaco expressando um *hairpin* da V-ATPase subunidade A apresentaram redução de 62% da expressão do gene alvo em apenas 8 dias além de causar a mortalidade dos insetos (Thakur et al., 2014).

Referências

- ACHOR, D.S.; ETXEBERRIA, E.; WANG, N.; FOLIMONOVA, S.Y.; CHUNG, K.R.; ALBRIGO, L.G. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with huanglongbing disease. **Plant Pathology Journal**, Pakistan, v.9, p.56-64, 2010.
- ALLAN, A.K.; DU, J.; DAVIES, S.A.; DO, J.A.T. Genome-wide survey of V-ATPase genes in *Drosophila* reveals a conserved renal phenotype for lethal alleles. **Physiological Genomics**, Rockville, v.22, p.128-138, 2005.
- AMMAR, E.D.; SHATTERS Jr. 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**, Berlim, v.159, p.726-734, 2011.
- ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOLT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v.64, p.5245-5250, 2004.
- ARAÚJO, E.F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo; Fundag, 2005. cap. 6, p.127-124.
- ARITUA, V.; ACHOR, D.; GMITTER, F.G.; ALBRIGO, G.; WANG, N. Transcriptional and microscopic analyses of citrus stem and root responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. **Plos One**, San Francisco, v.8, n. 9, 2013.
- ASGARI, S. MicroRNA functions in insect. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.43, p.388-397, 2013.
- BARRET, H.C., RHODES, A.M. A numerical study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. **Systematic Botany**, Kent, v.1, p.105-136, 1976.
- BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; BUSATO, L.A.; STUCHI, E.S. Damages caused by huanglongbing on sweet orange yield and quality in São Paulo. **Proceedings of the Huanglongbing-Greening International Workshop**. Ribeirão Preto SP, p.39, 2006.
- BAUM, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, New York, v.25, p.1322-1326, 2007.
- BELASQUE JÚNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R.B.; BARBOSA, J.C.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; MACHADO, M.A.; LEITE JUNIOR, R.P.; AYRES, A.J.; MASSARI, C.A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.34, p.137-145, 2009.

- BELASQUE JÚNIOR, J.; YAMAMOTO, P.T.; MIRANDA, M.P.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J.M. Controle do Huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, p.53-64, 2010.
- BEYENBACH, K.W.; WIECZOREK, H. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v.209, p.577-589, 2006.
- BOLOGNESI, R.; RAMASESHADRI, P.; ANDERSON, J.; BACHMAN, P.; CLINTON, W., FLANNAGAN, R.; ILAGAN, O.; LAWRENCE, C.; LEVINE, S.; MOAR, W. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). **PLoS ONE**. 7(10). 2012.
- BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. **Plant Science**, Limerick, v.164, p.423-438, 2003.
- BOVÉ, J.M.; RENAUDIN, J.; SAILLARD, C.; FOISSAC, X.; GARNIER, M. Spiroplasma citri, a plant pathogenic mollicute: relationships with its two hosts, the plant and the leafhopper vector. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.41, p.483-500, 2003.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.88, p.7-37, 2006.
- BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, p.611–622, 2009.
- CAPOOR, S.P.; RAO, D.G.; VISWANATH, S.M. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL CITRUS VIROLOGY, 6., 1974, Riverside. **Proceedings...**Riverside: University of California, 1974.
- CAPOOR, S.P.; RAO, D.G.; VISWANATH, S.M. *Diaphorina citri* Kuwayma, a vector of the greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.37, p.572–576, 1972.
- CARMELL, M.A.; XUAN, Z.; ZHANG, M.Q.; HANNON, G.J. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes and Development*, Woodbury, v.16, p.2733-2742, 2002.
- COSTA-LIMA, A.M. **Insetos do Brasil**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942. 101 p. (Série Didática, 3: Homoptera).
- CIPRIANO, D.J.; WANG, Y.; BOND, S.; HINTON, A.; JEFFERIES, K.C.; QI, J.; FORGAC, M. Structure and regulation of the vacuolar ATPases. **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**, Amsterdam, v.1777, p.599-604, 2008.

- COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; TARGON, M.L. P.N.; MOREIRA, M.C.P.Q.D.G.; POMPEU JR., J. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. **Euphytica**, Berlin. v.102, p.133-139, 1998.
- COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JUNIOR, J.; MACHADO, M.A.; AMARAL, A.M.; MULLER, G.W. First report of the causal agent of huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.88, p.1382, 2004.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, Acompanhamento da safra brasileira. Laranja, Safra 2013/2014, primeira estimativa, Maio 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 10 dez. 2016.
- COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. Disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br>. Acesso em: 10 dez, 2016.
- 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, 2013.
- FAGARD, M.; BOUTET, S.; MOREL, J.B.; BELLINI, C.; VAUCHERET, H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.97, p.11650–11654, 2000.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO **Agrianual 2016**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: Editora FNP, 2016. 456 p.
- FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/greening/10>. Acesso em: 10 dez. 2016.
- FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/presidente-da-camara-setorial-fala-sobre-mudancas-de-lei-para-a-citricultura-em-reuniao-com-ministro-da-agricultura/414> >. Acesso em: 10 dez. 2016.
- GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1445–1454, 2004.
- GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P.D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nature Reviews Genetics**, v.10, p.94–108, 2009.
- GOMEZ-TORRES, M.L. **Estudos bioecológicos de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) para o controle de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae)**. 2009. 138p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2009.

- GOTTWALD, T.R.; DA GRAÇA, J.V.; BASSANEZI, R.B. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, 2007, Online (doi: 10.1094/PHP-2007-0906-01- RV).
- GOTTWALD, T. R. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, v.48, p.119-139, 2010.
- GREEN, R.M., VARDI, A., GALUN, E. The plastome of Citrus. . Physical map, variation among Citrus and species and comparison with related genera. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v.72, p.170-177, 1986.
- GRISHOK, A. RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. **FEBS Letters**, v.579, p.5932–5939, 2005.
- GU, L.; KNIPPLE, D.C. Recent advances in RNA interference research in insects: implications for future insect pest management strategies. **Crop Protection**, Guildford, v.45, p.36-40, 2013.
- HAJERI, S.; KILLINY, N.; EL-MOHTARA, C.; DAWSONA, W.O.; GOWDAA, S. Citrus tristeza virus-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). **Journal of Biotechnology**, v.176, p.42–49, 2014.
- HALBERT, S.E.; NUÑEZ, C.A. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean basin. **Florida Entomologist** v.83, p.401-402, 2004.
- HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Lutz, v.87, p.330-353, 2004.
- HANDA, T., ISHIZAWA, Y., OOGAKI, C. Phylogenetic study of fraction I protein in the genus Citrus and its close related genera. **Japan Journal of Genetics**, Tokyo, v. 61, p. 15-24, 1986.
- HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v.11, p.1026 -1030, 1993.
- HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes & Immunity**, v.6, p.279–284, 2005.
- 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, p.227-235, 2010.
- INOUE, H.; IHONISHI, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MYATA, S.; IWANAMI, T.; ASHIHARA, W. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology**, Chichester, v.155, p.29-36, 2009.

- JACOB, F.; GUERTLER, R.; NAIM, S.; NIXDORF, S.; FEDIER, A.; HACKER, N.F.; HEINZELMANN-SCHWARZ, V. Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines. **PLoS One**, 8(3):e59180, 2013.
- JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v.44, p.379-386, 1994.
- JEFFERIES, K.C.; CIPRIANO, D.J.; FORGAC, M. Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.476, p.33-42, 2008.
- KATOCH, R.; SETHI, A.; THAKUR, N.; MURDOCK, L.L. RNAi for insect control: current perspective and future challenges. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.171, p.847-873, 2013.
- KIM, J.; SAGARAM, U.S.; BURNS, J.K.; LI, J.; WANG, N. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection: microscopy and microarray analyses. **Phytopathology**, Saint Paul, v.99, p.50-57, 2009.
- KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**, v.54, p.391-406, 2013.
- LEE, J.M.; ROCHE, J.R.; DONAGHY, D.J.; THRUSH, A.; SATHISH, P. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies of gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **BMC Molecular Biology**, v.11, p.8-21, 2010.
- LEE, J.A.; HALBERT, S.E.; DAWSON, W.O.; ROBERTSON, C.; KEESLING, J.E.; SINGER, B.H. Asymptomatic spread of huanglongbing and implications for disease control. **Proceedings of the National Academy of the Sciences of the USA**, v.112, p.7605–7610, 2015.
- LI, X.X.; ZHANG, M.Y.; ZHANG, H.Y. RNA Interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. **Plos One**, v.6, 2011.
- LIU, Y.H.; TSAI, J.H. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). **Annals of Applied Biology**, Chichester, v.137, p.201-206, 2000.
- LU, R.; MARTIN-HERNANDEZ, A.M.; PEART, J.R.; MALCUIT, I.; BAULCOMBE, D.C. Virus- induced gene silencing in plants. **Methods**, v.30, p.296–303, 2003.
- LU, Z.; ZHOU, Z.; XIE, R. Molecular phylogeny of the “true citrus fruit trees” group (Aurantioideae, Rutaceae) as inferred from chloroplast DNA sequence. **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v.10, p.49-57, 2011.
- LOPES, S.A.; LUIS, Q.B.; OLIVEIRA, H.T.; FRARE, G.F.; MARTINS, E.C.; AYRES, A.J. HLB research in Brazil – from etiology to disease management. **Proceedings of the 19th Conference IOCV**, p.47–50, 2013.

- LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N.G.; AYRES, A.J.; MARIN, D.R.; BOVÉ, J.M. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' is heat tolerant, '*Ca. L. americanus*' is heat sensitive. **Plant Disease**, v.93, p.257-262, 2009.
- LUIS, M., COLLAZO, C., LLAUGER, R., BLANCO, E., PEÑA, I., LOPEZ, D., GONZÁLEZ, C., CASIN, J.C., BATISTA, L., KITAJIMA, E., TANAKA, F.A.O., SALAROLI, R.B., TEIXEIRA, D.C., MARTINS, E.C., BOVÉ, J.M. Occurrence of citrus Huanglongbing in Cuba and association of the disease with *Candidatus* Liberibacter asiaticus. **Journal of Plant Pathology**, v.91, p.709-712, 2009.
- MACHADO, M.A.; LOCALI-FABRIS, E.C.; COLETTA-FILHO, H.D. *Candidatus* Liberibacter spp., agentes do huanglongbing dos citros. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, p.25-35, 2010.
- MAFRA, V.; MARTINS, P.K.; FRANCISCO, C.S.; RIBEIRO-ALVES, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M.A. *Candidatus* Liberibacter americanus induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **BMC Genomics**, v. 14, n. 247, 2013. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2164-14-247.pdf> >. Acesso em: 16 Jun. 2014.
- MANJUNATH, K.L.; RAMADUGU, C.; MAJIL, V.M.; WILLIAMS, S.; IREY, M.; LEE, R.F. First report of the citrus Huanglongbing associated bacterium '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' from sweet orange, Mexican lime, and Asian citrus psyllid in Belize. **Plant Disease**, v.94, p.781–781, 2010.
- 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, 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**, New York, v.25, p.1307-1313, 2007.
- MAO, Y.B.; TAO, X.Y.; XUE, X.Y.; WANG, L.J.; CHEN, X.Y. Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. **Transgenic Research**, Dordrecht, v.20, p.665-673, 2011.
- MARUTANI-HERT, M.; HUNTER, W.B.; KATSAR, C.S.; SINISTERRA, X.H.; HALL, D.G.; POWELL, C.A. Reovirus-like sequences isolated from adult Asian citrus psyllid, (Hemiptera: Psyllidae: Diaphorina citri). **Florida Entomologist**, Gainesville, v.92, p.314-320, 2009.
- MARTINEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; URLAUB, H.; LUHRMANN, R.; TUSCHL, T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. **Cell**, Cambridge, v.110, p.563–574, 2002.
- MARTÍNEZ, Y.; LLAUGER, R.; BATISTA, L.; LUIS, M.; IGLESIA, A.; COLLAZO, C.; PEÑA, I.; CASÍN, J.C.; CUETO, J.; TABLADA, L.M.; First report of '*Candidatus*

- Liberibacter asiaticus' associated with Huanglongbing in Cuba. **Plant Pathology** v.58, p.389-389, 2009.
- MATRANGA, C.; ZAMORE, P.D. Small silencing RNAs. **Current Biology**, v.17, p.789-793, 2007.
- MELLO, C.C., CONTE JR., D., Revealing the world of RNA interference. **Nature**, v.431, p.338-342, 2004.
- MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, London, v.431, p.343-349, 2004.
- MEAD, F.W.; FASULO, T.R. **Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Insecta: Hemiptera: Psyllidae)** Gainesville: University of Florida, 2011. 8p. (IFAS Extension, 33).
- MEIER, T.; POLZER, P.; DIEDERICH, K.; WELTE, W.; DIMROTH, P. Structure of the rotor ring of F-type Na⁺-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. **Science**, v.308, p.659- 662, 2005.
- MOORE, G.A. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. **Trends in Genetics**, London, v.17, p.536-540, 2001.
- MUTTI, N.S.; PARK, Y.; REESE, J.C.; REECK, G.R. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Science*, v.6, p.1-7 (2006).
- NEVES, M.F.; LOPES, F.F. **Estratégias para a laranja no Brasil**. São Paulo: Atlas, 2005. 225 p.
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; PEREIRA, F. C.; KALAKI, R. B. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. 1. ed. Ribeirão Preto, 2010. v.1.
- NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, p.1155-1166, 2000.
- NICOT, N.; HAUSMAN, J.F.; HOFFMANN, L.; EVERS, D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p.2907-2914, 2005.
- OBERHEIM, A.P.; BROWN, S.E.; MCLAUGHLIN, W.A. The identification and distribution of citrus greening disease in Jamaica. **Proceedings of the 2nd International Conference on Huanglongbing**. Florida Citrus Mutual, Orlando. pp.114, 2011.
- PARRA, J.R.P.; LOPES, J.R.S.; GOMEZ-TORRES, M.L.; NAVA, D.E.; PAIVA, P.E.B. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao Huanglongbing. **Citrus Research and Technology**, Cordeirópolis, v.31, p.37- 51, 2010.

- PELZ-STELINSKY, K.S.; BRLANSKY, R.H.; EBERT, T.A.; ROGERS, M.E. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 5, p. 1531-1541, 2010.
- PFAFFL, M.W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v.26, p.509-515, 2004.
- PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades copas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap. 3, p.39-60.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap. 4, p.63-104.
- PRICE, D.R.G.; GATEHOUSE, J.A. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v.26, p.393-400, May 2008.
- RAPACZ, M.; ST'PIE, A.; SKORUPA, K. Internal standards for quantitative RT-PCR studies of gene expression under drought treatment in barley (*Hordeum vulgare* L.): the effects of developmental stage and leaf age. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.34, p.1723-1733, 2012.
- ROOSE, M.L., TRAUGH, S.N. Identification and performance of Citrus trees on nucellar and zygotic rooststocks. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.113, p.100-105, 1988.
- RUAN, W.J.; LAI, M.D. Actin, a reliable marker of internal control? **Clinica Chimica Acta**, v.385, p.1-5, 2007.
- SALEH, M.C.; VAN RIJ, R.P.; HEKELE, A.; GILLIS, A.; FOLEY, E.; O'FARRELL, P.H.; ANDINO, R. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. **Nature Cell Biololoy**, v.8, p.793-802, 2006.
- SAPOUNTZIS, P.; DUPORT, G.; BALMAND, S.; GAGET, K.; JAUBERT-POSSAMAI, S.; FEBVAY, G.; CHARLES, H.; RAHBÉ, Y.; COLELLA, S.; CALEVRO, F. New insight into the RNA interference response against cathepsin-L gene in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: molting or gut phenotypes specifically induced by injection or feeding treatments. **Insect Molecular Biololoy**, v.51, p. 20-32, 2014.
- SCOTT, J.G.; MICHEL, K.; BARTHOLOMAY, L.C.; SIEGFRIED, B.D.; HUNTER, W.B.; SMAGGHE, G.; ZHU, K.Y.; DOUGLAS, A.E. Towards the elements of successful insect RNAi. **Journal of Insect Physiology**, v.59, p.1212-1221, 2013.
- SHABALINA, S.A.; KOONIN, E.V. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. **Trends in Ecology and Evolution**, v.23, p.578-587, 2008.

- SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J.; THEIN, S.L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v.7, p.1–9, 2006.
- SIOMI, H.; SIOMI, M.C. On the road to Reading the RNA-interference code. **Nature**, v.457, p.396–404, 2009.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. **Citrus**. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.) Advances in fruit breeding. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p.507-540.
- STUCHI, E.S.; GIRARDI, E.A. **Use of horticultural practices in citriculture to survive huanglongbing**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010. 71 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 189), 2010.
- SWINGLE, W.T.; REECE, R.C. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; BATCHELLOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. p.190-430.
- TANAKA, T. Fundamental discussion of Citrus classification. **Studia Citrogia**, Fukuoka-ken, v. 14, p. 1-6, 1977.
- TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS JUNIOR, W.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the ‘*Candidatus*’ Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, London, v.19, p.173-179, 2005.
- THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUMANS, B.; HENNEN, G.; GRISAR, T.; IGOUT, A.; HEINEN, E. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. **Journal of Biotechnolgy**, v.75, p.291–295, 1999.
- TERENIUS O, PAPANICOLAOU A, GARBUTT JS, ELEFThERIANOS I, HUVENNE H, KANGINAKUDRU S, ALBRECHTSEN M, AN C, AYMERIC JL, BARTHEL A, BEBAS P, BITRA K, BRAVO A, CHEVALIER F, COLLINGE DP, CRAVA CM, DE MAAGD RA, DUVIC B, ERLANDSON M, FAYE I, FELFÖLDI G, FUJIWARA H, FUTAHASHI R, GANDHE AS, GATEHOUSE HS, GATEHOUSE LN, GIEBULTOWICZ JM, GÓMEZ I, GRIMMELIKHUIJZEN CJ, GROOT AT, HAUSER F, HECKEL DG, HEGEDUS DD, HRYCAJ S, HUANG L, HULL JJ, IATROU K, IGA M, KANOST MR, KOTWICA J, LI C, LI J, LIU J, LUNDMARK M, MATSUMOTO S, MEYERING-VOS M, MILLICHAP PJ, MONTEIRO A, MRINAL N, NIIMI T, NOWARA D, OHNISHI A, OOSTRA V, OZAKI K, PAKONSTANTINO M, POPADIC A, RAJAM MV, SAENKO S, SIMPSON RM, SOBERÓN M, STRAND MR, TOMITA S, TOPRAK U, WANG P, WEE CW, WHYARD S, ZHANG W, NAGARAJU J, FFRENCH-CONSTANT RH, HERRERO S, GORDON K, SWEVERS L, SMAGGHE G. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **J Insect Physiol**, v.57, p.231–245, 2011.
- 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, 2014.

- TIAN, H.G.; PENG, H.; YAO, Q.; CHEN, H.X.; XIE, Q.; TANG, B.; ZHANG, W.Q. Developmental control of a Lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. **PloS One**, v. 4, 2009.
- TOMOYASU, Y.; MILLER, S.C.; TOMITA, S.; SCHOPPMIEIER, M.; GROSSMANN, D.; BUCHER, G. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. **Genome Biology**, v.9, p.10, 2008.
- TORRES, A.M., SOOST, R.K., DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. **American Journal of Botany**, v.65, p.869-881, 1978.
- TRUJILLO-ARRIGA, J., SANCHEZ, A.H.; ROBLES, G.P.; DE LA ROSA, A.A.; DELGADILLO, V.I.; MARQUEZ, S.M. Antecedentes y situacion actual de Huanglongbing de los citricos en Mexico. **Memoria 1er Simposio Nacional Sobre Investigaci on para el Manejo del Psilido Asiático de los Citricos y el HLB en Mexico**, p.1-7, 2010.
- ULVILA, J.; PARIKKA, M.; KLEINO, A.; SORMUNEN, R.; EZEKOWITZ, R.A.; KOCKS, C.; RAMET, M. Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptormediated endocytosis in *Drosophila* S2 cells. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.281, p.14370-14375, 2006.
- UPADHYAY, S.K.; CHANDRASHEKAR, K.; THAKUR, N.; VERMA, P.C.; BORGIO, J.F.; SINGH, P.K.; TULI, R. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.36, p.153-161, 2011.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, p.1-12, 2002.
- VIENNE, A.; SHIINA, T.; ABI-RACHED, L.; DANCHIN, E.; VITIELLO, V.; CARTAULT, F.; INOKO, H.; PONTAROTTI, P. Evolution of the proto-MHC ancestral region: more evidence for the plesiomorphic organisation of human chromosome 9q34 region. **Immunogenetics**, v.55, p.429-436, 2003.
- WATERHOUSE, P.M.; WANG, M.B.; LOUGH, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. **Nature**, v.411, p.834-842, 2001.
- WIECZOREK, H.; BEYENBACH, K.W.; HUSS, M.; VITAVSKA, O. Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v.212, p.1611-1619, 2009.
- WINSTON, W.M.; MOLODOWITCH, C.; HUNTER, C.P. Systemic RNAi in *C-elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. **Science**, Washington, v.295, p.2456-2459, 2002.
- WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v.39, p.75-85, 2005.

- WURIYANGHAN, H.; ROSA, C.; FALK, B.W. Oral delivery of double-stranded RNAs and siRNAs induces RNAi effects in the potato/tomato psyllid, *Bactericerca cockerelli*. **Plos One**, v.6, 2011.
- XIE, F.; XIAO, P.; CHEN, D.; XU, L.; ZHANG, B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology**, v.80, p.75–84, 2012.
- YAMAMOTO, M., KOBAYASHI, S., NAKAMURA, Y., YAMADA, Y. Phylogenic J. Citrus revealed by RFLP analysis of mitochondrial and chloroplast DNA. **Japanese Journal Breeding**, Tokyo, v.43, p.355-365, 1993.
- YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE, M.R.; GARBIM, L.F.; COELHO, J.H.C.; XIMENES, N.L.; MARTINS, E.C.; LEITE, A.P.R.; SOUSA, M.C.; ABRAHÃO, D.P.; BRAZ, J.D. *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. **Huanglongbing-Greening International Work- shop** (ed. by AJ Ayres, E Nogueira, JRP Parra, JM Bove', MA Machado & O Bergamashi), p. 96. Fundecitrus, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, Julho, p. 16–20, 2006.
- YANG, J.; HAN, Z.J. Optimisation of RNA interference-mediated gene silencing in *Helicoverpa armigera*. **Austral Entomology**, v.53, p.83–88, 2014.
- YU, N.; CHRISTIAENS, O.; LIU, J.; NIU, J.; CAPPELLE, K.; CACCIA, S.; HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. **Insect Science**, v.20, p.4–14, 2013.
- YU, X.D.; LIU, Z.C.; HUANG, S.L.; CHEN, Z.Q.; SUN, Y.W.; DUAN, P.F.; MA, Y.Z.; XIA, L.Q. RNAi-mediate plant protection against aphids. **Pest Management Science**, v.72, p.1090-1098, 2015.
- ZHUANG, Z.; LINSER, P.J.; HARVEY, W.R. Antibody to H⁺ V-ATPase subunit E localizes with proteasomes in alkaline larval midgut of a freshwater mosquito (*Aedes aegypti* L.). **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v.202, p.2449-2460, 1999.

3. SELEÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA QUANTITATIVA EM *DIAPHORINA CITRI*

Resumo

O psilídeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri*, é o principal vetor das bactérias associadas ao Huanglongbing, doença que tem ameaçado a citricultura mundial. A ausência de medidas curativas e de cultivares resistentes tem levado a utilização de análise de expressão gênica através do RT-qPCR no estudo deste psilídeo, visando seu controle. O sucesso desta técnica depende de seleção e validação de genes de referência, para normalização dos dados. Entretanto, ainda não foram identificados genes de referência apropriados para *D. citri*. Neste estudo, foram avaliados seis genes candidatos: *fator de elongação 1 alfa (EF 1- α)*, *actina (ACT)*, *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)*, *proteína ribossomal L7 (RPL7)*, *proteína ribossomal L17 (RPL17)* e *alfa tubulina (TUB)*. A estabilidade destes genes foi analisada através dos algoritmos matemáticos Delta Ct, NormFinder, BestKeeper e Genorm em cinco estádios de desenvolvimento e dois hospedeiros (*Citrus sinensis* e *Murraya paniculata*). O ranqueamento final dos genes foi obtido através do RefFinder e a validação dos mesmos através do gene *V-ATPase-A*. Para análise de expressão gênica, independentemente da fase de desenvolvimento do inseto, quando utiliza-se *M. paniculata* como hospedeiro de criação, recomenda-se a utilização dos genes *GAPDH* e *RPL7*, enquanto que para *C. sinensis* sugerem-se os genes *GAPDH* e *EF 1- α* .

Palavras-chave: *Citrus sinensis*; Estágio de desenvolvimento; Psilídeo; RT-qPCR

Abstract

The Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, is considered the main vector of the bacteria associated to huanglongbing (HLB), a very serious disease that has threatened the world citrus industry. The absence of efficient control management protocols, including the lack of resistant cultivars, has led to the development of different approaches to study this pathosystem, since the production of resistant genotypes up to *D. citri* gene expression analyses by RT-qPCR to achieve vector population control. RT-qPCR analyses depend upon proper reference gene selection and validation, in order to precise data validation. However, adequate *D. citri* reference genes have not yet been identified. In the present study, we evaluated the genes *elongation factor 1 alpha (EF 1- α)*, *actin (ACT)*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*, *ribosomal protein L7 (RPL7)*, *ribosomal protein L17 (RPL17)* e *alpha tubulin (TUB)* as putative or candidate reference genes for this insect. Gene expression stability was evaluated through the mathematical algorithms Delta Ct, NormFinder, BestKeeper and Genorm, in five insect developmental stages, grown in two plant hosts (*Citrus sinensis* and *Murraya paniculata*). The final gene ranking was calculated by RefFinder software, and *V-ATPase-A* gene was selected for validation. As for

gene expression studies in *D. citri* reared in *M. paniculata*, regardless the insect developmental stage, *GAPDH* and *RPL7* have the best fit as reference genes in RT-qPCR analyses, whereas *GAPDH* and *EF 1- α* are recommended as reference genes in insect studies that have been reared in *C. sinensis*.

Keywords: *Citrus sinensis*; Developmental stages; Psyllid; RT-qPCR

3.1. Introdução

O psíldeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), é o principal vetor das bactérias associadas ao Huanglongbing (HLB) (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (CLas) e “*Candidatus Liberibacter americanus*” (CLam)). Essa doença tem ameaçado a citricultura mundial devido aos danos que causa, à dificuldade de manejo, à sua rápida disseminação e por afetar praticamente todas as espécies e cultivares de citros (Bové, 2006). O HLB avança de maneira muito rápida, reduzindo a quantidade de plantas e elevando os custos de produção. Na Flórida, 70% das plantas estão contaminadas e previsão de safra 2016/2017 é de 70 milhões de caixas, o que representa uma redução de 14% em relação a safra anterior (USDA, 2017). No Brasil, desde de seu primeiro registro em 2004 (Teixeira et al., 2004) até o primeiro semestre de 2016, mais de 44 milhões de plantas foram eliminadas apenas no estado de São Paulo (CDA, 2016).

D. citri possui uma gama de hospedeiros, especialmente, plantas da família Rutaceae (Sapindales), incluindo o gênero *Citrus* (Aubert 1987; Halbert & Manjunath 2004) e a murta-de-cheiro ou falsa murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack], a qual é considerada hospedeiro preferencial deste inseto (Halbert & Manjunath, 2004, Teck et al. 2012). Embora *D. citri* seja capaz de explorar um grande número de hospedeiros, nem todos permitem o desenvolvimento completo do inseto. A utilização de um hospedeiro em potencial envolve uma série de fatores, tais como aquisição de nutrientes, quebra de defesas da planta e prevenção a intoxicações, fatores os quais afetam sua alimentação e “fitness” (Simon et al., 2015).

Até o momento, não há métodos curativos para essa doença, e seu controle é baseado apenas em medidas preventivas, tais como a utilização de mudas sadias, eliminação de plantas sintomáticas dos pomares, e controle populacional do vetor, realizado basicamente por meio do uso de inseticidas (Gottwald, 2010). Considerando a severidade do HLB, a ausência de medidas curativas e de cultivares de citros resistentes e opções para o controle do vetor, o uso de técnicas de biologia molecular no estudo deste psíldeo pode gerar ferramentas que auxiliem no manejo deste inseto nos pomares.

A análise de expressão gênica através do RT-qPCR tem sido muito utilizada em estudos entomológicos visando compreender o comportamento dos insetos em condições bióticas, abióticas e em diferentes estádios de desenvolvimento (Ibanez & Tamborindeguy, 2016; Korumutla et al., 2016; Nakamura et al., 2016; Shakeel et al., 2015). Essa técnica permite quantificar a expressão de genes de interesse através da comparação do nível de expressão do mesmo através de genes de referência conhecidos por serem expressos de forma estável.

Apesar da alta sensibilidade e grande precisão da técnica do RT-qPCR na análise de expressão gênica, citam-se algumas limitações tais como variações entre as amostras, variação na reação de transcrição reversa e na eficiência do PCR, que podem levar a alterações nos valores de Ct (Bustin et al., 2005). Portanto, a precisão nos resultados desta análise depende de uma seleção apropriada de genes de referência para cada condição experimental.

Para a maioria dos estudos de expressão gênica são utilizados genes constitutivos como genes de referência, pois, assume-se que suas expressões permanecem inalteradas independentemente das variações na condição fisiológica das amostras e dos tratamentos utilizados (Vandesompele et al., 2002; Li et al., 2013; Kozera & Rapacz, 2013). Entretanto, diversos estudos têm questionado o uso universal destes genes como genes de referência, pois, verificaram que a maioria destes genes tem demonstrado expressões variáveis em função do tipo de organismo, de sua fase de desenvolvimento e das condições experimentais (Kozera & Rapacz, 2013; Yang et al., 2015; Ma et al., 2016). Dessa forma, para a realização de estudos de expressão gênica, é necessário a seleção e validação de genes de referência de acordo com o organismo e com as condições experimentais adotadas.

O objetivo deste trabalho foi selecionar genes de referência apropriados para desenvolver métodos de análise de expressão gênica por RT-qPCR mais precisos e abrangentes para *D. citri*. Foram avaliados seis genes candidatos: *fator de alongação 1- α* (*EF 1- α*), *actina* (*ACT*), *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* (*GAPDH*), *proteína ribossomal L7* (*RPL7*), *proteína ribossomal L17* (*RPL17*) e *α -tubulina* (*TUB*) como potenciais genes de referência. A estabilidade destes genes foi avaliada através de quatro algoritmos matemáticos em cinco estádios de desenvolvimento em dois hospedeiros.

3.2. Materiais e Métodos

Condições experimentais

Os insetos utilizados foram obtidos da criação de manutenção do laboratório de Manejo Integrado de Pragas do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, criados em murta (*M. paniculata*) de acordo com metodologia adaptada de Parra et al. (2016).

Para a realização do estudo do gene de referência em função da fase de desenvolvimento de *D. citri* e em diferentes hospedeiros; adultos de *D. citri*, plantas de laranja ‘Valência’ [*Citrus sinensis*, (L.) Osbeck] e plantas de murta (*M. paniculata*) foram acondicionados em gaiolas de tecido do tipo voal (35 cm de comprimento x 35 cm de largura x 53 cm de altura), por 48 horas para oviposição nos dois hospedeiros. Após esse período, os insetos adultos foram retirados e as plantas com ovos foram mantidas nas mesmas gaiolas em condições controladas com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; 70% U.R e fotoperíodo de 14:10h.

Para o referido experimento, três réplicas biológicas independentes compostas de um *pool* de 150 ninfas de primeiro e segundo ínstar (N12); 30 ninfas de terceiro ínstar (N3); 10 ninfas de quarto e quinto ínstar (N45); 3 adultos recém emergidos (coletados 24 horas após sua emergência) (A1D); e 3 adultos coletados 10 dias após a emergência (A10D). As amostras de adultos foram coletadas sem a separação dos sexos.

Foi avaliada a expressão dos genes candidatos durante os diferentes estádios ninfaís e adultos com diferentes idades, nos dois hospedeiros. Todos os espécimes coletados foram instantaneamente congelados em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenados a -80°C até a extração de RNA.

Seleção do gene de referência e desenho de iniciadores

Foram selecionados seis genes candidatos comumente utilizados para estudos de expressão gênica em hemípteros: *fator de alongação 1- α* (*EF 1- α*), *actina* (*ACT*), *gliceradeído-3-fosfato desidrogenase* (*GAPDH*), *proteína ribossomal L7* (*RPL7*), *proteína ribossomal L17* (*RPL17*) e *α -tubulina* (*TUB*). A sequência destes genes em *D. citri* foram obtidas na base de dados do NCBI e os iniciadores desenhados através da ferramenta Realtime PCR Tool (<http://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>) (Tabela 1). A análise de formação de estruturas secundárias e dimerização dos iniciadores foi realizada no software online NetPrimer

(<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>).

Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total de todas as amostras foi isolado utilizando o TRizol® (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração, pureza e integridade foram verificadas em Nanodrop (Thermo Scientific™) e eletroforese em gel de agarose 1,0%. O RNA extraído foi tratado com DNase I Amplification Grade (Invitrogen™) e 500 ng deste RNA tratado foram utilizados para síntese de 20 µl de cDNA através da enzima M-MLV reverse transcriptase (Fermentas). As amostras foram armazenadas a – 20°C até o uso.

Análise da expressão gênica quantitativa por RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram realizadas com o reagente Sybr Master Mix Fast (Invitrogen) no equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) 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. Ao final de cada reação de RT-qPCR, foi gerada uma curva de Melting de 60°C a 95°C visando garantir a especificidade dos produtos amplificados. Cada reação foi composta de 6 µl de Sybr Master Mix Fast (Invitrogen), 0,15 µl de cada iniciador, 2,7 µl de água livre de RNase e 1 µl de cDNA. A concentração de cDNA foi determinada através de curva padrão baseada em uma diluição seriada (1:5, 1:25, 1:125, 1:625). As eficiências específicas para cada par de iniciadores, para cada gene, foram calculadas utilizando o modelo de regressão linear. As eficiências de amplificação para cada gene foram calculadas de acordo com a seguinte equação: $E = (10^{(-1/\text{slope})} - 1 \times 100)$ (Pfaffl, 2001). Cada amostra foi preparada em triplicata biológica e cada reação analisada em triplicata técnica.

Determinação da estabilidade de expressão dos genes de referência candidatos

A estabilidade dos genes candidatos foi calculada utilizando-se os seguintes algoritmos estatísticos: geNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004), BestKeeper (Pfaffl et al., 2004) e método comparativo Delta Ct (Silver et al., 2006). O BestKeeper utiliza dados brutos (valores de Ct) e a eficiência de amplificação de reação (E) para calcular os padrões mais adequados e determinar um índice.

O algoritmo geNorm calcula um valor de estabilidade de expressão (M) para cada gene, em um determinado conjunto de amostras, e os classifica. Quanto mais baixo for o valor M, maior é a estabilidade de expressão. O valor M inferior a 1,5 é recomendado para identificar genes expressos de forma estável. O R-based SLqPCR package foi utilizado para determinar a variação da combinação dos genes (*pairwise variation*) (V_n/V_{n+1}). Este índice foi

utilizado para determinar o número adequado de genes de referência para maior precisão na normalização do RT- qPCR. Um valor de V_n/V_{n+1} abaixo de 0,15 sugere que não há necessidade de gene de referência adicional para normalização dos dados (Vandesompele et al., 2002). Este algoritmo estatístico inicia a análise utilizando dois genes e adiciona continuamente um outro gene e recalcula o *ratio* do fator de normalização. Se o gene adicionado não aumentar a relação do fator de normalização no valor de corte sugerido (0,15), o par de genes é considerado suficiente para normalizar os dados, caso contrário, mais genes de referência devem ser incorporados.

O NormFinder calcula a estabilidade da expressão do gene para todas as amostras, em um determinado número de grupos, baseado nas variações intra e inter grupos. Estes valores são combinados para classificar os genes de acordo com a variação de suas expressões. Genes com o menor valor gerado pelo algoritmo são considerados mais estáveis. No método comparativo delta Ct, a classificação é determinada baseada em comparações de pares de genes usando valores médios de delta Ct, dentro de um determinado tratamento. Portanto, o desvio padrão da média de cada gene é inversamente proporcional à estabilidade de expressão. Ao final, o programa RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>) foi utilizado para determinar uma classificação geral dos genes candidatos. Este atribui um peso para cada gene e calcula a média geométrica dos mesmos para determinar uma classificação geral (Xie et al., 2011).

Validação da seleção dos genes de referência

Para validar a seleção dos genes de referência, foi quantificada a expressão de uma *ATPase vacuolar subunidade A* (*V-ATPase-A*) (Acessão number: FK254156.1) de *D. citri* para as diferentes fases de desenvolvimento nos dois hospedeiros estudados. Para isso, utilizou-se como fator de normalização o número de genes indicados pela análise de variação da combinação dos genes (*pairwise variation*) e os genes de referência classificados pelo software RefFinder. Para cada hospedeiro, a análise foi realizada utilizando um único gene de referência (o mais estável – [NF1] e o menos estável [NF6]) e com os dois genes de referência mais estáveis (NF1 e NF2) como fator de normalização para análise da expressão da *V-ATPase-A*. Para o cálculo da expressão deste gene, o estádio N12 foi utilizado como controle. As eficiências de amplificação e a quantificação relativa da expressão do gene alvo foram calculadas de acordo com o método descrito por Pfaffl (2001). A significância dos dados de expressão relativa do gene alvo, normalizadas usando o gene mais estável, o menos estável e a

combinação recomendada foi verificada através do teste de Dunnett a 5% de probabilidade, através do software SAS (Statistical Analysis System, V. 9.3, Cary, NC, USA).

3.3. Resultados

Eficiência dos iniciadores para a análise de RT-qPCR

A especificidade dos iniciadores dos seis genes de referência candidatos e do gene alvo foram avaliadas através de análise de PCR seguido de visualização em gel de agarose 1.0%. Para todos os iniciadores projetados, foi visualizado um único *amplicon* de acordo com o tamanho esperado. Uma curva padrão foi gerada para cada gene estudado através de diluição seriada (1:5; 1:125; 1:500; 1:625) de cDNA. A especificidade de amplificação dos iniciadores foi confirmada através de um único pico na análise da curva de melting. As eficiências dos iniciadores variaram de 82.54% a 105.77% e os coeficientes de correlação (R^2) ficaram entre 0,950 e 0,998 (Tabela 1). A diluição de cDNA utilizada para as análises de RT-qPCR foi a de 1:5.

Tabela 1. Características dos genes e respectivos iniciadores utilizados para análise de RT-qPCR dos genes de referência candidatos e do gene alvo, *V-ATPase-A*.

Símbolo do gene	Nome do gene	Número de acesso (NCBI)	Função do gene	Sequência dos iniciadores (5'- 3')	Tamanho do produto (bp)	Eficiência (%)	Tm (°C)	R ²
<i>ACT</i>	<i>Actina</i>	DQ675553.1	constituente estrutural do citoesqueleto	F: CCATCTTGGCTTCTCTGTCTAC R: CATTTGCGGTGAACGATTCC	91	101,62	60	0,966
<i>α-TUB</i>	<i>Alfa-tubulina</i>	DQ675550.1	constituente estrutural do citoesqueleto	F: GGTTC AAGGTGGGTATCAACTAT R: TAGCGGTGGTGTGGAAAG	102	105,77	60	0,977
<i>EF 1-α</i>	<i>Fator de elongação 1 alfa</i>	XM_008479903.1	tradução da atividade do fator de elongação	F: ACCACCACCAACACATCTAC R: ACTTCTTCTCCTCCTCTCATCT	119	92,83	60	0,998
<i>GAPDH</i>	<i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>	XM_008481619.1	enzima glicolítica	F: GACACTCACTCCTCCATCTTTG R: GTATCCGTACTCGTTGTCATACC	96	95,03	60	0,995
<i>RPL7</i>	<i>Proteína ribossomal L7</i>	XM_008476740.1	constituente estrutural do ribossomo	F: GAGGTGTTCACTGTTGGAGATAA R: TCTTACGCCATCCTCCAGTA	91	94,87	60	0,952
<i>RPL17</i>	<i>Proteína ribossomal L17</i>	NM_001297694.1	constituente estrutural do ribossomo	F: CCAGGAATCCCACCAAATCA R: AAGAACTTGATGGCTCGTCTC	121	98,85	60	0,991
<i>V-ATPase -A</i>	<i>ATPase vacuolar subunidade A</i>	FK254156.1	acidificação de organelas; pH homeostase; energização da membrana	F: GGAAGTCATATCACTGGTGGAG R: AAGTGACAGTACCCTTAGCTTTAG	94	82,54	60	0,95

F, forward primer; R, reverse primer; Tm, temperatura de melting; R², coeficiente de correlação.

Características de expressão dos genes de referência candidatos

Os valores de Ct obtidos para os seis genes candidatos a normalizadores foram utilizados para estimar a estabilidade de expressão dos mesmos durante os cinco estádios de desenvolvimento e nos dois hospedeiros estudados. A média dos valores de Ct dos genes de referência variaram de 17,91 (*ACT*) a 29,37 (*TUB*). A menor variabilidade de expressão foi observada para o gene *GAPDH* ($21,27 \pm 0,59$) e para a *ACT* ($17,91 \pm 0,72$). Os genes da *TUB* ($20,37 \pm 3,01$) e *RPL17* ($22,26 \pm 1,00$) apresentaram as maiores variações de expressão para o conjunto de amostras utilizadas (Figura 1).

Figura 1. Expressão (C_t) dos seis genes de referência candidatos de *Diaphorina citri* em cinco estágios de desenvolvimento (N12, N3, N45, A1D, A10D) e dois hospedeiros (*Citrus sinensis*, *Murraya paniculata*). Os pontos indicam o valor da média de cada amostra, e as barras correspondem ao desvio padrão da média.

Estabilidade dos genes de referência candidatos

Os genes candidatos foram ranqueados por meio de cinco algoritmos estatísticos de acordo com a estabilidade de expressão apresentada para os diferentes estádios de desenvolvimento e hospedeiros estudados. A classificação dos genes variou em função do algoritmo utilizado. Entretanto, o gene *EF 1-α* foi classificado entre os três mais estáveis no ranque dos cinco *softwares*, enquanto que *TUB* foi considerado o gene menos estável para estágios de desenvolvimento nos dois hospedeiros estudados (Tabela 2). Para melhor

entendimento do ranqueamento dos genes de referência, cada método estatístico utilizado foi detalhado separadamente.

Método *DeltaCt*. Este método identificou os genes *EF 1- α* , *GAPDH* e *RPL7* como os três genes de referência mais estáveis para todas as fases de desenvolvimento em *M. paniculata* e *C. sinensis*. Para as mesmas condições, *TUB* foi o gene que apresentou menor estabilidade de expressão (Tabela 2).

***BestKeeper*.** Este modelo matemático classificou os genes *GAPDH*, *EF 1- α* e *RPL7* como os três genes de referência de expressão mais estável para *C. sinensis*. Para a *M. Paniculata*, foram os genes *GAPDH*, *ACT* e *EF 1- α* que ocuparam as três primeiras posições no ranqueamento, respectivamente. Este algoritmo estatístico também classificou *TUB* como o gene menos indicado para normalização dos dados de expressão gênica de *D. citri*, para diferentes estádios de desenvolvimento (Tabela 2).

***NormFinder*.** Baseado no ranqueamento deste algoritmo, os níveis de expressão gênica foram mais consistentes para os genes *GAPDH*, *ACT* e *EF 1- α* para as diferentes fases de desenvolvimento e hospedeiros utilizados. O gene *TUB*, novamente, foi o menos indicado para normalização dos dados para condições experimentais utilizadas (Tabela 2).

***geNorm*.** Este algoritmo estatístico classificou os genes das proteínas ribossomais *RPL7* e *RPL17*, seguidos do *GAPDH* e *EF 1- α* como os mais estáveis para as condições experimentais utilizadas. Para o gene *TUB*, foi observado maior variação da expressão gênica e por isso ficou em último lugar no ranque, para ambos hospedeiros (Tabela 2). Através da análise de variação da combinação dos genes (*pairwise variation*), constatou-se que, para os cinco estágios de desenvolvimento analisados, é necessário utilizar dois genes de referência para normalização dos dados, para ambos hospedeiros, pois os valores de $V_{2/3}$ ficaram abaixo de 0,15 (Figura 2).

Tabela 2. Estabilidade e ranqueamento de seis genes de referência de *Diaphorina citri* utilizando quatro algoritmos em cinco estágios de desenvolvimento (N12, N3, N45, A1D, A10D) e dois hospedeiros

Hospedeiro	Gene de referência	ΔCT		BestKeeper		Norfinder		geNorm	
		Estabilidade	Ranque	Estabilidade	Ranque	Estabilidade	Ranque	Estabilidade	Ranque
<i>Citrus sinensis</i>	<i>ACT</i>	1,265	4	0,606	4	0,279	2	0,682	5
	<i>α-TUB</i>	3,35	6	2,682	6	3,324	6	1,442	4
	<i>EF 1-α</i>	1,143	1	0,547	2	0,368	3	0,453	3
	<i>GAPDH</i>	1,149	2	0,439	1	0,279	1	0,580	2
	<i>RPL7</i>	1,223	3	0,620	3	0,784	4	0,371	1
	<i>RPL17</i>	1,319	5	0,780	5	1,006	5	0,371	1
<i>Murraya panicutala</i>	<i>ACT</i>	1,414	5	0,508	2	0,277	2	0,804	4
	<i>α-TUB</i>	3,396	6	2,571	6	3,363	6	1,552	5
	<i>EF 1-α</i>	1,292	2	0,714	3	0,731	3	0,445	2
	<i>GAPDH</i>	1,220	1	0,422	1	0,277	1	0,635	3
	<i>RPL7</i>	1,336	3	0,836	4	0,914	4	0,382	1
	<i>RPL17</i>	1,383	4	0,891	5	1,031	5	0,382	1

Figura 2. Número de genes adequado para normalização dos dados de expressão em *Diaphorina citri*. A variação de combinação dos genes (*pairwise variation*) foi analisada pelo pacote R-based SLqPCR entre os fatores de normalização NF_n and $NF_{(n+1)}$ para determinar o número adequado de genes de referência para normalização dos dados em uma determinada classe de experimento. O valor abaixo de 0,15 indica que a adição de mais um gene de referência não acarretará em melhoria significativa na normalização dos dados de RT-qPCR.

RefFinder. Este software foi utilizado visando obter uma classificação geral dos genes candidatos a referência, considerando os resultados dos quatro algoritmos estatísticos utilizados anteriormente. Para as diferentes fases de desenvolvimento e em ambos hospedeiros, os três genes de expressão mais estáveis foram *GAPDH*, *RPL7* e *EF 1- α* , enquanto que o de menor estabilidade foi *TUB* (Figura 3).

Figura 3. Estabilidade de expressão de seis genes de referência candidatos de *Diaphorina citri* em cinco estágios de desenvolvimento (N12, N3, N45, A1D, A10D) e dois hospedeiros (*Murraya paniculata*, *Citrus sinensis*). A média de estabilidade de expressão dos genes de referência foi calculada pelo método da média geométrica através do *software RefFinder*. Os menores valores de média geométrica indicam maior estabilidade de expressão.

Validação dos genes de referência

Para verificação da performance dos genes de referência selecionados, a expressão do gene *V-ATPase-A* foi analisada nas mesmas condições experimentais utilizadas para a análise de estabilidade de expressão dos genes de referência candidatos. Os dados

consolidados pelo software RefFinder indicaram que, para *C. sinensis*, os dois genes mais estáveis são o *GAPDH* e o *EF 1- α* , enquanto que para *M. paniculata* os dois genes indicados são *GAPDH* e *RPL7*. O gene de expressão menos estável foi *TUB* para ambos hospedeiros. A aplicabilidade destes genes de referência foi analisada através de sua utilização para normalização da expressão da *V-ATPase-A*, tanto isolado como combinados.

Para *C. sinensis*, os resultados de expressão da *V-ATPase-A* para cada fase de desenvolvimento do inseto foram similares quando utilizados o gene de referência de maior estabilidade e a combinação dos dois genes de referência mais estáveis como normalizadores (Figura 4B). Em *M. paniculata*, apenas o adulto recém emergido apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) na expressão da *V-ATPase-A* em relação a N12, quando utilizado somente o gene de referência mais estável como normalizador. Entretanto, quando o cálculo da expressão do gene alvo foi calculado utilizando somente o gene de referência de menor estabilidade (*TUB*) foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) de expressão do gene *V-ATPase-A* nos estádios N45, A1D e A10D para *M. paniculata* e A1D e A10D para *C. sinensis* (Figura 4A).

Figura 4. Variação nos dados de expressão relativa do gene *V-ATPase-A* normalizados com diferentes genes de referência e suas respectivas combinações em cinco estágios de desenvolvimento e dois hospedeiros diferentes. (NF1) gene de referência mais estável *GAPDH*; (NF1-2) combinação do *GAPDH* e *RPL7* para *Murraya paniculata*; (NF1-2) combinação do *GAPDH* e *EF 1-α* para *Citrus sinensis* e o gene de referência menos estável *TUB* (NF6) foram usados como normalizadores. Os dados correspondem à média de três replicatas biológicas e as barras representam o desvio padrão da média. A comparação das médias de expressão relativa do gene *V-ATPase-A* foi realizada através do teste de Dunnett ($P < 0.05$). * indica diferença significativa entre os valores.

3.4. Discussão

Neste trabalho, foram avaliados e validados seis genes de referência para análise de expressão gênica por RT-qPCR em *D. citri*, em cinco fases de desenvolvimento e em dois hospedeiros. Assim como observado para os lepidópteros, *Helicoverpa armigera* (Shakeel et al., 2005; Chandra et al., 2014), *Thitarodes armoricanus* (Liu et al., 2016), *Spodoptera exigua* (Teng et al., 2012) e *Spodoptera litura* (Lu et al., 2013) e para o afídeo *Lipaphis eysimi*

(Koramutla et al., 2016), o gene de referência que apresentou alta estabilidade de expressão para as diferentes fases de desenvolvimento em *D. citri*, em ambos hospedeiros, foi *GAPDH*. Este gene atua no metabolismo energético, codificando enzimas da via glicolítica (Chapuis et al., 2011). Entretanto, este gene não revelou estabilidade satisfatória em experimentos realizados com os hemípteros *Frankliniella occidentalis* (Yuan et al., 2014) e *Aphis gossypii* (Ma et al., 2016). Uma baixa estabilidade para o referido gene também foi observada em *Diabrotica virgifera virgifera* (Rodrigues et al., 2014), e em mosca-das-frutas, *Anastrepha obliqua* (Nakamura et al., 2016). Tal divergência nos resultados pode ser devido ao fato deste gene estar diretamente envolvido em processos metabólicos. Devido ao dinamismo desses processos, estes podem ser regulados de forma diferente em função do estágio fisiológico em que o inseto se encontra, dificultando a utilização do *GAPDH* na normalização dos dados de expressão gênica para todas as espécies (Chapuis et al., 2011).

EF 1- α apresentou a segunda e a terceira maior estabilidade de expressão para os diferentes fases de desenvolvimento, para os insetos criados em *C. sinensis* e *M. paniculata*, respectivamente. Este gene desempenha uma importante função no processo de tradução gênica. Atua catalisando a ligação de dependentes de GTP do sítio aminoacil do tRNA ao seu sítio receptor no ribossomo (Ponton et al. 2011, Lu et al., 2013, Shang et al., 2015). A estabilidade de expressão desse gene parece ser comum na ordem Hemiptera, uma vez que nossos resultados corroboram com os obtidos para outros hemípteros tais como *Toxoptera citricida* (Shang et al., 2015), *Bactericera cockerelli* (Ibanez et al., 2016) e *Nilaparvata lugens* (Yuan et al., 2014). Entretanto, para *Bemisia tabaci* (Collins et al., 2014), este gene não apresentou estabilidade de expressão adequada para as diferentes fases de desenvolvimento. Esta instabilidade também foi observada para representantes da ordem Lepidoptera, tais como *Helicoverpa armigera* (Chandra et al., 2014) e *Spodoptera litura* (Lu et al., 2013).

As proteínas ribossomais *RPL7* e *RPL17*, ambas constituintes da subunidade 60S, apresentaram estabilidades diferentes quando utilizadas como genes de referência para avaliação de expressão gênica nas fases de desenvolvimento de *D. citri*. Em ambos hospedeiros estudados, observou-se melhor desempenho da *RPL7* em relação a *RPL17*. Proteínas ribossomais têm se mostrado como bons genes normalizadores para análises de RT-qPCR, em diferentes estádios de desenvolvimento em diversas espécies de insetos, tais como a *RPL7* em *Aphis gossypii* (Ma et al, 2016), *RPS18* em *Lipaphis eysimi* (Koramutla, et al., 2016), *RPL5* e *RPS18* em *Bactericera cockerelli* (Ibanez & Tamborindéguy, 2016). Apesar de serem constituintes da mesma subunidade ribossomal, essas proteínas podem apresentar

variações de expressão em função das condições experimentais e do organismo utilizado (Yang et al., 2015, Yuan et al., 2014, Sun et al., 2015).

ACT é a proteína mais abundante nas células eucarióticas e parte constituinte dos filamentos do citoesqueleto. Está envolvida em diversos processos celulares tais como mobilidade celular, contração muscular, citocinese e divisão celular (Niu et al. 2012; Lu et al. 2013). Embora seja um gene comumente utilizado como normalizador em análises de RT-qPCR, este não tem apresentado resultados satisfatórios de estabilidade de expressão para diversos organismos quando se comparam os diferentes estádios de desenvolvimento de um inseto. Como a *ACT* está envolvida em diversos processos celulares, é esperado que seu nível de transcrição seja variável em função das fases de desenvolvimento, como observado neste trabalho para *D. citri*. A instabilidade deste gene de referência também foi relatada em *Helicoverpa armigera* (Zhang et al. 2014; Shakeel et al., 2015), *Nilaparvata lugens* (Yuan et al., 2014), *Bemisia tabaci* (Li et al. 2013), *Spodoptora litua* (Lu et al., 2013), *Frankliniella occidentalis* (Zheng et al., 2014) e *Sesamia inferens* (Sun et al., 2015).

Os quatro algoritmos estatísticos utilizados nesse estudo classificaram *TUB* como o gene de referência de menor estabilidade em *D. citri*, em ambos hospedeiros. Esta proteína é constituinte dos microtúbulos que compõem o citoesqueleto e estão envolvidos em processos de divisão celular e organização do citoplasma, incluindo posicionamento de organelas (González et al., 1998). O seu envolvimento na divisão celular pode ser a razão de sua expressão ser variável em diferentes estádios de desenvolvimento, uma vez que, durante o processo de mudança entre os estágios, a divisão celular ocorre em maior intensidade (González et al., 1998). Os resultados observados neste trabalho em *D. citri* evidenciaram essa variação na expressão do gene *TUB*, pois, ocorreu maior expressão deste no estágio ninfal em relação à fase adulta (Figura 4). Resultados semelhantes foram observados em *Aphis gossypii* (Ma et al., 2016), *Helicoverpa armigera* (Zhang et al., 2014; Shakeel et al., 2015), *Sesamia inferens* (Sun et al., 2015), *Toxoptera citricida* (Shang et al., 2015). Entretanto, para condições experimentais com indução de stress térmico (Shang et al., 2015; Sun et al., 2015; Zheng et al., 2014), populações de diferentes origens (Yuan et al., 2014) e fotoperíodo (Shakeel et al., 2015), este gene foi considerado adequado para normalização dos dados de RT-qPCR.

A utilização de diferentes algoritmos estatísticos para avaliação dos genes de referência mostrou variações no ranqueamento dos mesmos, em função dos diferentes modelos matemáticos considerados. Dessa forma, observa-se que a utilização um *software* que reúna estes resultados em um único ranque facilita a escolha dos genes de referência para

normalização dos dados. Estudos com genes de referência têm mostrado a necessidade da utilização de mais de um gene como normalizador dos dados para obtenção de resultados mais precisos (Kozera & Rapacz, 2013). De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, para *D. citri*, recomenda-se a utilização de dois genes de referência quando consideram-se diferentes hospedeiros e fase de desenvolvimento distintas. Tais resultados foram confirmados através da validação realizada pela normalização dos dados de expressão do gene *V-ATPase-A*.

Os resultados aqui discutidos mostram que há variação na estabilidade da expressão dos genes de referência entre as diferentes ordens de inseto e até mesmo dentro de uma mesma ordem, como por exemplo nos hemípteros. Dessa forma, ressalta-se a importância de seleção de genes de referência adequados para cada espécie e condição experimental envolvida. Os resultados obtidos permitem concluir que, para análise de expressão gênica, independentemente da fase de desenvolvimento de *D. citri*, quando utiliza-se *M. paniculata* como hospedeiro de criação, recomenda-se a utilização dos genes *GAPDH* e *RPL7*, enquanto que para *C. sinensis* sugerem-se os genes *GAPDH* e *EF 1- α* .

Referências

- Andersen, C. L., Jensen, J. L. and Orntoft, T. F. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**: 5245-5250.
- Aubert, B. (1987) *Trioza-erytrae* (del-Guercio) and *Diaphorina-citri* Kuwayama (Homoptera, Psylloidea), the 2 vectors of citrus greening disease - Biological aspects and possible control strategies. *Fruits* **42**: 149-162.
- Bové, J. M. (2006) Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J Plant Pathol* **88**: 7-37.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T. and Pfaffl, M. W. (2005) Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J Mol Endocrinol* **34**: 597-601.
- Chandra, G. S., Asokan, R., Manamohan, M., Krishna Kumar, N. K. and Sita, T. (2014) Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Mol Biol* **48**: 813-822.
- Collins, C., Patel, M. V., Colvin, J., Bailey, D. and Seal, S. (2014) Identification and Evaluation of Suitable Reference Genes for Gene Expression Studies in the Whitefly *Bemisia tabaci* (Asia I) by Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR. *J Insect Sci* **14**: 1-25.

- Coordenadoria de Defesa Agropecuária (2016) Dados da Citricultura Paulista, *Secretaria de Agricultura e Abastecimento*, Campinas, São Paulo, Brazil.
- Gonzalez, C., Tavosanis, G. and Mollinari, C. (1998) Centrosomes and microtubule organisation during *Drosophila* development. *J Cell Sci* **111**: 2697-2706.
- Gottwald, T. R. (2010) Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. *Annu Rev Phytopathol* **48**: 119-139.
- Halbert, S. E. and Manjunath, K. L. (2004) Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha : Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Fla Entomol* **87**: 330-353.
- Ibanez, F. and Tamborindéguy, C. (2016) Selection of reference genes for expression analysis in the potato psyllid, *Bactericera cockerelli*. *Insect Mol Biol* **25**: 227-238.
- Koramutla, M. K., Aminedi, R. and Bhattacharya, R. (2016) Comprehensive evaluation of candidate reference genes for qRT-PCR studies of gene expression in mustard aphid, *Lipaphis erysimi* (Kalt). *Sci Rep* **6**: 1-10.
- Kozera, B. and Rapacz, M. (2013) Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* **54**: 391-406.
- Li, R., Xie, W., Wang, S., Wu, Q., Yang, N., Yang, X., Pan, H., Zhou, X., Bai, L., Xu, B., Zhou, X. and Zhang, Y. (2013) Reference Gene Selection for qRT-PCR Analysis in the Sweetpotato Whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *PLoS One* **8**: e53006.
- Liu, G., Qiu, X., Cao, L., Zhang, Y., Zhan, Z. and Han, R. (2016) Evaluation of Reference Genes for Reverse Transcription Quantitative PCR Studies of Physiological Responses in the Ghost Moth, *Thitarodes armoricanus* (Lepidoptera, Hepialidae). *PLoS One* **11**: e0159060.
- Lu, Y., Yuan, M., Gao, X., Kang, T., Zhan, S., Wan, H. and Li, J. (2013) Identification and Validation of Reference Genes for Gene Expression Analysis Using Quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS One* **8**: e68059.
- Ma, K., Li, F., Liang, P., Chen, X. and Liu, Y. (2016) Identification and Validation of Reference Genes for the Normalization of Gene Expression Data in qRT-PCR Analysis in *Aphis gossypii* (Hemiptera : Aphididae). *J Insect Sci* **16**: 1-9.
- Nakamura, A. M., Chahad-Ehlers, S., Lima, A. L. A., Taniguti, C. H., Sobrinho Jr., I., Torres, F. R. and de Brito, R. A. (2016) Reference genes for accessing differential expression among developmental stages and analysis of differential expression of OBP genes in *Anastrepha obliqua*. *Sci Rep* **6**: 1-10.
- Niu, J.-Z., Dou, W., Ding, T.-B., Yang, L.-H., Shen, G.-M. and Wang, J.-J. (2012) Evaluation of suitable reference genes for quantitative RT-PCR during development and abiotic stress in *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae). *Mol Biol Rep* **39**: 5841-5849.

- Parra, J. R. P., Alves, G. R., Diniz, A. J. F., Vieira, J. M. (2016) *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) $\times$ *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): Mass Rearing and Potential Use of the Parasitoid in Brazil. *J Integr Pest Manag* **7**: 1-11.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: 2003-2007.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. and Neuvians, T. P. (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26**: 509-515.
- Ponton, F., Chapuis, M.-P., Pernice, M., Sword, G. A. and Simpson, S. J. (2011) Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* **57**: 840-850.
- Rodrigues, T. B., Khajuria, C., Wang, H., Matz, N., Cardoso, D. C., Valicente, F. H., Zhou, X. and Siegfried, B. (2014) Validation of Reference Housekeeping Genes for Gene Expression Studies in Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *PLoS One* **9**: e109825.
- Shakeel, M., Zhu, X., Kang, T., Wan, H. and Li, J. (2015) Selection and evaluation of reference genes for quantitative gene expression studies in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Asia Pac Entomol* **18**: 123-130.
- Shang, F., Wei, D.-D., Jiang, X.-Z., Wei, D., Shen, G.-M., Feng, Y.-C., Li, T. and Wang, J.-J. (2015) Reference Gene Validation for Quantitative PCR Under Various Biotic and Abiotic Stress Conditions in *Toxoptera citricida* (Hemiptera, Aphididae). *J Econ Entomol* **108**: 2040-2047.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J. and Thein, S. L. (2006) Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol* **7**: 1-9.
- Simon, J.-C., D'Alencon, E., Guy, E., Jacquin-Joly, E., Jaquier, J., Nouhaud, P., Peccoud, J., Sugio, A. and Streiff, R. (2015) Genomics of adaptation to host-plants in herbivorous insects. *Brief Funct Genomics* **14**: 413-423.
- Sun, M., Lu, M.-X., Tang, X.-T. and Du, Y.-Z. (2015) Exploring Valid Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Analysis in *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS One* **10**: e0115979.
- Teck, S. L. ., Fatimah, A., Beattie, A., Heng, R. K. J. and King, W. S. (2011) Influence of Host Plant Species and Flush Growth Stage on the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. *Am J Agric Biol Sci* **6**: 536-543.
- Teixeira, D. C., Saillard, C., Couture, C., Martins, E. C., Wulff, N. A., Eveillard-Jagoueix, S., Yamamoto, P. T., Ayres, A. J. and Bove, J. M. (2008) Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in Sao Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Mol Cell Probes* **22**: 139-150.

- Teng, X., Zhang, Z., He, G., Yang, L. and Li, F. (2012) Validation of Reference Genes for Quantitative Expression Analysis by Real-Time RT-PCR in Four Lepidopteran Insects. *J Insect Sci* **12**: 1-17.
- USDA (2016) Citrus: November Forecast. Available at: http://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Florida/Publications/Citrus/Citrus_Forecast/2016-17/cit1016.pdf. (Accessed: 3 February 2017).
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**: 1-12.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L. and Zhang, B. (2012) miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol* **80**: 75-84.
- Yang, C., Li, H., Pan, H., Ma, Y., Zhang, D., Liu, Y., Zhang, Z., Zheng, C. and Chu, D. (2015) Stable reference gene selection for RT-qPCR analysis in nonviruliferous and viruliferous *Frankliniella occidentalis*. *PLoS One* **10**: e0135207.
- Yang, C., Pan, H., Liu, Y. and Zhou, X. (2015) Temperature and Development Impacts on Housekeeping Gene Expression in Cowpea Aphid, *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphididae). *PloS One* **10**: e0130593.
- Yuan, M., Lu, Y., Zhu, X., Wan, H., Shakeel, M., Zhan, S., Jin, B.-R. and Li, J. (2014) Selection and Evaluation of Potential Reference Genes for Gene Expression Analysis in the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) Using Reverse-Transcription Quantitative PCR. *PLoS One* **9**: e86503.
- Zhang, S., An, S., Li, Z., Wu, F., Yang, Q., Liu, Y., Cao, J., Zhang, H., Zhang, Q. and Liu, X. (2015) Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Gene* **555**: 393-402.
- Zheng, Y.-T., Li, H.-B., Lu, M.-X. and Du, Y.-Z. (2014) Evaluation and Validation of Reference Genes for qRT-PCR Normalization in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera:Thripidae). *PLoS One* **9**: e111369.

4. CONTROLE DE *DIAPHORINA CITRI* POR RNAi EM LARANJA DOCE EXPRESSANDO RNA DE FITA DUPLA DO GENE *V-ATPASE-A*

Resumo

O silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi) através da utilização de plantas transgênicas expressando RNA de fita dupla tem pode ser aplicado como uma nova ferramenta biotecnológica no manejo de pragas, pois, proporciona um controle eficiente e gene-espécie específica. Neste trabalho, avaliou-se a biologia do psílideo *D. citri*, principal vetor das bactérias associadas à doença huanglongbing (HLB), em plantas transgênicas de laranja doce expressando o dsRNA do gene *DcV-ATPase-A*. Uma vez que não há medidas curativas para esta doença, o controle do inseto vetor, tornou-se uma das principais formas de manejo da mesma. Avaliou-se a mortalidade de psíldeos adultos alimentados em plantas transgênicas, assim como alterações na duração das fases, sobrevivência, razão sexual, longevidade e expressão relativa de insetos de *D. citri* que desenvolveram seu ciclo biológico nas plantas de laranja doce expressando dsRNA do gene *DcV-ATPase-A*. Constataram-se a internalização pelo inseto das moléculas de dsRNA/siRNA produzidas pelas plantas transgênicas e o potencial de redução da expressão do gene alvo pelo RNAi. Apesar da ausência de fenótipo letal em psíldeos adultos alimentados nas plantas transgênicas, verificou-se diminuição na expressão relativa deste gene para estes insetos, assim como redução na duração da fase ovo-adulto, sobrevivência e longevidade de *D. citri* quando este desenvolveu seu ciclo biológico nas plantas que expressam dsRNA do gene *DcVATPase-A*.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*; Psílideo; Silenciamento gênico

Abstract

Gene silencing by RNA interference (RNAi) through transgenic plants expressing double-stranded RNA is new biotechnological tool in pest management, since it provides an efficient gene-specie-specific control. In this work, the biology of *D. citri*, the main vector of the bacteria associated to huanglongbing (HLB) was evaluated in sweet orange transgenic plants expressing the dsRNA of the *DcV-ATPase-A* gene. Since there are no curative methods for this disease, the control of the insect vector, has become one way of handling the same. In the bioassays performed, it was evaluated the adult psyllids mortality fed on transgenic plants, as well as variations in cycle duration, survival, sex ratio, longevity and relative expression of *D. citri* that developed their biological cycle in sweet orange plants expressing dsRNA of the gene *DcV-ATPase-A*. We have demonstrated the insect's internalization of the dsRNA / siRNA molecules produced by the transgenic plants and the potential for reducing the target gene expression by RNAi. Despite the absence of a lethal phenotype in adult psyllids fed on transgenic plants, there was a decrease in the relative expression of *DcVATPase-A* for these insects, as well as a reduction in the egg-adult phase

duration, survival and longevity of *D. citri* when this developed its biological cycle in plants expressing dsRNA of the *DcVAPTase-A* gene.

Keywords: *Citrus sinensis*; Psyllid; Gene silencing

4.1. Introdução

A citricultura representa um importante segmento da agricultura mundial, com uma produção de 137 milhões de toneladas, sendo os principais países produtores China, Brasil, Índia e Estados Unidos da América (FAO, 2016). Entretanto, em 2015, o Brasil apresentou uma redução de 3,6 milhões de toneladas de laranjas produzidas em relação a 2011 (FNP, 2016) e foram eliminadas 44 milhões de plantas desde de 2004 (Coordenadoria de Defesa Agropecuária, 2016). Esses prejuízos têm sido causados, principalmente, pelo aumento da incidência do huanglongbing (HLB), doença que tem ameaçado este importante setor do agronegócio devido aos danos que causa, à dificuldade de manejo, à sua rápida disseminação e por afetar praticamente todas as espécies e cultivares de citros (Bové, 2006). Esta doença também tem causado perdas na Flórida, que registrou uma das mais baixas safras dos últimos 50 anos (2015/2016), devido a contaminação de aproximadamente 70% de suas plantas (USDA, 2016).

O HLB é associado a três espécies de bactérias de colonização restrita ao floema (Bové, 2006) denominadas *Candidatus Liberibacter* spp., as quais são transmitidas por insetos vetores (psílídeos) (Jagoueix; Bové; Garnier, 1994). Os principais sintomas da doença são folhas com “mosqueado” verde e amarelo, nervuras mais grossas e escurecidas, desfolha e morte de ponteiros, frutos assimétricos, com tamanho reduzido, maturação incompleta, mais ácidos, com valores menores de sólidos solúveis, ratio e porcentagem de suco, sementes abortadas e vasos alaranjados (Bassanezi, et al., 2006; Belasque Júnior et al., 2009). Dados coletados em diferentes regiões citrícolas do mundo, inclusive em São Paulo, mostram que pomares afetados podem tornar-se totalmente inviáveis economicamente entre sete e dez anos após o aparecimento da primeira planta sintomática (Gottwald et al., 2007).

Nos países asiáticos e americanos, a principal forma de disseminação da doença ocorre através do inseto vetor, o psílídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), que está associado à transmissão das bactérias *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) e *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas). Os psílídeos apresentam cinco instares ninfais, e podem adquirir a bactéria a partir do 2º instar. Entretanto, somente ninfas de 4º e 5º instares e adultos são capazes de transmiti-la.

O controle biológico desta praga já foi estudado e existem dois parasitóides conhecidos para o controle de *D. citri*: *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae) e *Tamarixia radiata* Waterston (Hymenoptera: Eulophidae) (Halbert; Manjunath, 2004). Entretanto, o uso de inseticidas constitui a principal medida de controle utilizada pelos produtores, o que traz diversas preocupações tais como o desenvolvimento de resistência à molécula do inseticida (Marutani-Hert et al., 2009), e implicações ambientais e econômicas devido ao uso indiscriminado destes insumos nos pomares (Stuchi; Girardi, 2010).

Considerando a severidade do HLB, a ausência de medidas curativas e de cultivares de citros resistentes, uma nova possibilidade no controle do inseto vetor tem sido estudada através do silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi). Este sistema baseia-se na supressão da expressão de genes através da introdução de RNA de cadeia dupla exógena (dsRNA) em células de organismos eucariotos, onde são clivadas em pequenos RNAs não codantes que atuam promovendo a degradação rápida do mRNA contendo a sequência homóloga ao dsRNA, levando ao silenciamento pós-transcricional do gene em questão (Mello; Conte, 2004; Fagard et al., 2000). Essa maquinaria de RNAi tem dois componentes principais: o componente do núcleo no interior das células, o qual é composto por enzimas Dicer, fatores de ligação a RNA e proteína Argonata; e o componente sistêmico que amplifica o sinal de dsRNA e permite que espalhe para outros tecidos dentro do organismo (Siomi; Siomi, 2009). Esta amplificação do sinal de silenciamento, em plantas e no nematóide *Caenorhabditis elegans*, é conduzida pela enzima ‘RNA polimerase RNA-dependente’ (RdRP, do inglês “RNA-dependent RNA polymerase”) porém, até o momento, nenhum homólogo de RdRp foi verificado no genoma de qualquer inseto com genoma sequenciado (Tomoyasu et al., 2008). Dessa forma, em insetos, o sucesso na utilização do sistema de RNAi depende de uma maneira adequada de fornecimento de dsRNA, pois, o processo de silenciamento gênico necessita da ação da molécula efetora dentro das células do organismo alvo. Logo, o fator limitante para o sucesso da aplicação está vinculado a absorção deste RNA nas células-alvo e sua disseminação pelo organismo (Huvenne; Smaghe, 2010).

A maioria dos trabalhos publicados com silenciamento gênico para controle de pragas tem utilizado a introdução do dsRNA através de microinjeção no trato digestório e dietas artificiais. Apesar do sucesso obtido com essas técnicas para validação dos genes em espécies como *Bactericera cockerelli* (Wuriyangan et al., 2011); *Nilaparvata lugens* (Li et al., 2011); *Bemisia tabaci* (Upadhyay et al., 2011); *Spodoptera exigua* (Tian et al., 2009); *Bactrocera dorsalis* (Li; Zhang; Zhang, 2011); *Helicoverpa armigera* (Yang; Han, 2014) e *Diaphorina citri* (El-Shesheny et al., 2013), apenas a transformação genética de plantas é

realmente efetiva para o controle de pragas em condições de campo (Mao et al., 2007). Para que ocorra a ativação do mecanismo de RNAi, a planta transformada via *Agrobacterium tumefaciens* deve carregar vetores de expressão contendo sequências repetidas e invertidas do gene alvo do inseto, as quais formam RNA na forma de um *hairpin* quando transcritas, os quais são funcionalmente equivalentes a um dsRNA (Gu; Knipple, 2013).

Larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com dieta artificial de plantas de tabaco e de *Arabidopsis* expressando o dsRNA do gene P450 monoxigenase, que confere a tolerância das larvas ao gossipol, apresentaram redução significativa na expressão deste gene (Mao et al., 2007). Quando tais larvas foram alimentadas em dieta contendo gossipol, foi observado um significativo retardamento do crescimento. Em trabalho seguinte, Mao et al. (2011) produziram plantas transgênicas de algodão expressando o dsRNA do gene de P450 monoxigenase, e estas plantas apresentaram uma maior resistência a *Helicoverpa armigera*, comprovando a eficiência da técnica. Plantas transgênicas de milho e tabaco, expressando o dsRNA do gene que codifica a subunidade A da ATPase vacuolar de *Diabrotica virgifera virgifera* e *Bemisia tabaci*, respectivamente, mostraram que as plantas de milho apresentaram níveis consideráveis de proteção quando comparadas com a planta controle e as plantas de tabaco promoveram silenciamento significativo do gene alvo, causando a mortalidade do inseto vetor (Baum et al., 2007; Thakur et al., 2014).

O complexo multienzimático das ATPases vacuolares é altamente conservado e distribuído entre diferentes organismos eucariontes. Estão presentes em compartimentos intracelulares de membranas como vacúolos, lisossomos, vesículas sinápticas, vesículas de reserva nutricional, glândulas secretoras e vesículas derivadas do complexo de Golgi. Atuam como bombas de prótons dirigidas por ATP, participando da acidificação de organelas celulares e transporte de prótons H^+ através de membranas plasmáticas (Allan et al., 2005; Cipriano et al., 2008). Em insetos, as V-ATPases são encontradas nas membranas apicais de tecidos epiteliais, incluindo glândulas salivares, intestino médio e túbulos de Malpighi, onde participam da energização do transporte ativo secundário através destes epitélios (Allan et al., 2005). A V-ATPase é uma enzima de subunidades múltiplas, composta de dois domínios funcionais V1 e V0. As subunidades A estão localizadas no domínio periférico V1, localizado no citoplasma, composto de oito subunidades diferentes em uma estequiometria A3B3CDE2FG2H, e interage com ATP, ADP e Pi. (Beyenbach; Wiczorek, 2006; Jefferies; Cipriano; Forgac, 2008).

Diante das dificuldades encontradas no melhoramento convencional de citros (Soares Filho et al., 2002), da severidade do HLB, da ausência de medidas curativas e da dificuldade

de controle do inseto vetor, a utilização do silenciamento gênico por RNAi apresenta-se como uma alternativa para o manejo adequado desta doença em citros. Uma vez que esta ferramenta proporciona uma ação eficiente e gene-espécie específica, sua utilização no manejo de pragas pode ser uma alternativa de controle do HLB, com maior eficiência e menor impacto ambiental (Price; Gatehouse, 2008). Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a biologia *D. citri* em plantas transgênicas de laranja doce expressando dsRNA do gene *DcV-ATPase-A* visando seu controle.

4.2. Materiais e Métodos

Condições experimentais

Os insetos utilizados foram obtidos da criação de manutenção do laboratório de Manejo Integrado de Pragas do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. Estes foram criados em murta (*M. paniculata*) de acordo com metodologia adaptada de Parra et al. (2016).

Para manutenção da criação de *D. citri* foram colocados insetos, semanalmente, para postura dos ovos. Para isso, 180 psíldeos adultos, com idade entre 1 a 3 semanas foram acondicionados em gaiolas de tecido do tipo voal (35 cm de comprimento x 35 cm de largura x 53 cm de altura) contendo de 3 a 4 mudas de *Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutacea) recentemente podadas. Estas plantas apresentaram, em média, 30 cm de altura e brotações novas, inclusive folhas ainda fechadas, pois estas são as preferidas pelas fêmeas para oviposição. Após 7 a 8 dias de postura, os adultos foram retirados para que fosse possível acompanhar a eclosão dos ovos e o desenvolvimento das ninfas até a emergência dos adultos. Em média, cada ínstar ninfal teve três dias de duração, logo, 15 dias após o período de oviposição obtiveram-se psíldeos adultos jovens que foram utilizados para os bioensaios. A criação foi mantida a 25 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10h (L:E).

Foram utilizadas plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ [*Citrus sinensis*, (L.) Osbeck], expressando um *hairpin* de uma sequência conservada da *DcV-ATPase-A* obtidas por Silva (2013), provenientes de oito eventos de transformação (V2, V13, V18, V25, V32, V33, V34, V40), através de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. A produção de dsRNA foi confirmada por análise de siRNA blot (Silva, 2013). Plantas transgênicas matrizes mantidas em casa de vegetação do Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP) foram propagadas por enxertia (borbulhia em “T” invertido), em porta-enxerto limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck) e conduzidas para formação de mudas. Plantas de laranja ‘Valência’ não

transgênicas produzidas através de cultura de tecido, também foram propagadas por enxertia em limão ‘Cravo’ e utilizadas como testemunhas. As mudas recém formadas foram podadas para o geração de brotos onde foram colocadas as gaiolas com os insetos.

Sobrevivência de psíldeos adultos em plantas transgênicas

Gaiolas confeccionadas com tecido tunil e tubo Falcon de 50 mL foram utilizadas para acondicionar 10 psíldeos adultos em 8 eventos de plantas transgênicas de laranja ‘Valência’, e plantas não transgênicas provenientes de cultura de tecidos. As gaiolas de tecido tunil foram somente costuradas para formação de uma circunferência que se ajustasse ao ramo da planta, enquanto que o experimento com o tubo Falcon foi conduzido de acordo com metodologia descrita por Ammar et al. (2013) (Figura 5).

As plantas de citros recém podadas com os insetos acondicionados em gaiolas de tecido tunil foram alocadas em casa de vegetação para condução do experimento em condições ambiente de temperatura e umidade. As gaiolas de tubo Falcon com os psíldeos e as folhas das plantas de citros foram colocadas na sala da criação em condições controladas de 25 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10h (L:E).

Figura 5. Gaiolas confeccionadas com tecido tunil (A) e tubo Falcon (B) de 50 mL utilizadas para acondicionar 10 psíldeos adultos em plantas de citros.

Para ambos ensaios foram utilizados 10 insetos adultos jovens por gaiola com avaliações da taxa de sobrevivência dos psílídeos após 15 dias para o experimento conduzido nas gaiolas de tecido tunil e 10 dias para os insetos acondicionados nas gaiolas de tubo Falcon. Após o período de avaliação, psílídeos sobreviventes foram coletados e agrupados em amostras de três insetos para composição de uma réplica biológica para análise de expressão gênica. Todos os espécimes coletados foram instantaneamente congelados em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenados a -80°C até a extração de RNA. As amostras de insetos adultos foram coletadas sem a separação dos sexos.

Foram avaliados 9 tratamentos (8 eventos transgênicos e 1 tratamento testemunha) em delineamento experimental do tipo bloco casualizado, sendo 3 blocos com 2 repetições e uma parcela composta por 1 gaiola com 10 insetos adultos.

Biologia de *D. citri* em plantas transgênicas

Plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ [*Citrus sinensis*, (L.) Osbeck], pré-selecionadas, V13, V18, V33, V34 e V40, expressando dsRNA do gene *DcV-ATPase-A* e plantas controle não transgênicas provenientes de cultura de tecidos recém podadas foram utilizadas para realização da biologia da *D. citri*.

Um casal de *D. citri* com 15 dias de vida (correspondente ao período de pré-oviposição) foi confinado em cada planta, por 24 horas, utilizando-se gaiolas de tecido tunil. Após esse período, os casais foram retirados e os ovos contados com o auxílio de um microscópio estereoscópico. O trabalho foi desenvolvido em sala climatizada mantida na temperatura de $25 \pm 2^{\circ}$, U.R. de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14:10h (L:E) (Figura 6).

Diariamente, foi realizada a contagem de ninfas eclodidas e a mortalidade das mesmas até a emergência dos adultos. As variáveis avaliadas foram: tempo de desenvolvimento, viabilidade e razão sexual. Adultos recém eclodidos foram coletados e agrupados em amostras de três insetos para composição de uma réplica biológica para análise de expressão gênica. Todos os espécimes coletados foram instantaneamente congelados em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenados a -80°C até a extração de RNA.

Os estudos sobre a biologia da *D. citri* foram realizados em duas épocas: primavera-verão e outono-inverno. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (tratamentos x época) com seis tratamentos e quatro repetições e uma parcela experimental composta por uma planta com um casal de psílídeos.

Figura 6. Plantas (A) e brotação (B) de laranja ‘Valência’ utilizadas para o experimento de biologia de *D. citri* em sala climatizada. Temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14:10h (L:E).

Visando avaliar a longevidade dos psílídeos criados nas plantas transgênicas de citros, casais recém-emergidos de *D. citri* provenientes dos mesmos seis eventos transgênicos avaliados e plantas controle foram dispostos em gaiolas de tunil e acondicionados em mudas do mesmo tratamento no qual haviam sido criados. Foi avaliado o período de sobrevivência destes casais através do acompanhamento e avaliações diárias da mortalidade destes insetos. Para esta avaliação, os adultos foram separados por sexo. Este trabalho foi desenvolvido em sala climatizada mantida na temperatura $25 \pm 2^\circ$, U.R. de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14:10h (L:E). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em um total de 4 repetições para cada tratamento.

Desenho de iniciadores, extração de RNA e síntese de cDNA

A sequência do gene da *VATPase-A* e dos genes de referência *fator de elongação 1 α* (*Ef - 1 α*), *proteína ribossomal L7 (RPL7)* e *proteína ribossomal L17 (RPL17)* de *D. citri* foram obtidas na base de dados do NCBI e os iniciadores desenhados através da ferramenta Realtime PCR Tool (<http://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>) (Tabela 1). A análise de formação de estruturas secundárias e dimerização dos iniciadores foi realizada no software online NetPrimer (www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html). A

estabilidade dos genes de referência foi analisada e atestada através de diferentes algoritmos matemáticos: Delta Ct, NormFinder, BestKeeper e Genorm.

O RNA total de todas as amostras foi isolado utilizando o TRizol® (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração, pureza e integridade foram verificadas em Nanodrop (Thermo Scientific™) e eletroforese em gel de agarose 1,0%. O RNA extraído foi tratado com DNase I Amplification Grade (Invitrogen™) e 500 ng deste foram utilizados para síntese de 20 µl de cDNA através da enzima M-MLV reverse transcriptase (Fermentas). As amostras foram armazenadas a – 20°C até o uso.

Análise da expressão gênica quantitativa por RT - qPCR

As reações de RT- qPCR foram realizadas com o reagente Sybr Master Mix Fast (Invitrogen) no equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster city, CA) 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. Ao final de cada reação de RT-qPCR, foi gerada uma curva de Melting de 60°C a 95°C visando garantir a especificidade dos produtos amplificados. Cada reação foi composta de 6 µl de Sybr Master Mix Fast (Invitrogen), 0,15 µl de cada iniciador, 2,7 µl de água livre de RNase e 1 µl de cDNA. A concentração de cDNA foi determinada através de curva padrão baseada em uma diluição seriada (1:5, 1:25, 1:125, 1:625). As eficiências específicas para cada par de iniciadores, para cada gene, foram calculadas utilizando o modelo de regressão linear. As eficiências de amplificação e a quantificação relativa da expressão do gene *DcV-ATPase-A* foram calculadas de acordo com o método descrito por Pfaffl (2001) (Tabela 3). Cada amostra foi preparada em triplicata biológica e cada reação analisada em triplicata técnica.

Análises estatísticas

Os dados referentes a mortalidade, tempo de desenvolvimento, viabilidade, razão sexual, tempo de sobrevivência da segunda geração dos psilídeos e expressão relativa dos genes foram analisados quanto à sua normalidade, homogeneidade de variância e transformação ótima de Box-Cox. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett ao nível 10% de probabilidade. A correlação dos dados foi realizada através do coeficiente de Spearman. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SAS® versão 9.1.

Tabela 3. Características dos genes e respectivos iniciadores utilizados para análise de RT-qPCR em *D. citri*.

Símbolo do gene	Nome do gene	Número de acesso (NCBI)	Função	Sequência dos iniciadores (5'- 3')	Tamanho do produto (bp)	Eficiência (%)	Tm (°C)	R ²
<i>EF 1-α</i>	<i>Fator de elongação 1 alfa</i>	XM_008479903.1	tradução da atividade do fator de elongação	F: ACCACCACCAACACATCTAC R: ACTTCTTCTCCTCCTCTCATCT	119	92,83	60	0,998
<i>RPL7</i>	<i>Proteína ribossomal L7</i>	XM_008476740.1	constituente estrutural do ribossomo	F: GAGGTGTTCACTGTTGGAGATAA R: TCTTACGCCATCCTCCAGTA	91	94,87	60	0,952
<i>RPL17</i>	<i>Proteína ribossomal L17</i>	NM_001297694.1	constituente estrutural do ribossomo	F: CCAGGAATCCCACCAAATCA R: AAGAACTTGATGGCTCGTCTC	121	98,85	60	0,991
<i>V-ATPase -A</i>	<i>ATPase vacuolar subunidade A</i>	FK254156.1	acidificação de organelas; pH; homeostase; energização da membrana	F: GGAAGTCATATCACTGGTGGAG R: AAGTGACAGTACCCTTAGCTTTAG	94	82,54	60	0,95

F, forward primer; R, reverse primer; Tm, temperatura de melting; R², coeficiente de correlação.

4.3. Resultados

Sobrevivência de psilídeos adultos em plantas transgênicas

A avaliação de psilídeos adultos jovens em plantas transgênicas de laranja ‘Valência’, tanto em condições ambiente (tecido tunil) como controlada (tubo Falcon), mostrou que não houve efeito dos eventos transgênicos na mortalidade de adultos de *D. citri*. Para ambos experimentos, a porcentagem de mortalidade natural dos psilídeos, avaliada nas plantas testemunhas, foi de 7,50% e 10,00% em tecido tunil e tubo Falcon, respectivamente (Tabela 4).

Os resultados obtidos nos experimentos em tubo Falcon confirmaram que a alimentação dos psilídeos nos eventos transgênicos avaliadas, por um período de 10 dias, não interferiu na sobrevivência dos mesmos, uma vez que todos os insetos que se alimentaram nas plantas de eventos transgênicos apresentaram menor porcentagem de mortalidade quando comparados à testemunha (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem de mortalidade de *D. citri* alimentados em plantas de oito evento transgênicos de laranja ‘Valência’ e acondicionados em gaiolas de tecido tunil e tubo Falcon e em condições ambiente (casa de vegetação) e controlada (Temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h).

Tratamentos	Mortalidade (%)	
	Tecido tunil	Tubo Falcon
Testemunha	$7,50 \pm 8,66$	$10,00 \pm 8,94$
V2	$1,85 \pm 4,53$	$1,66 \pm 4,08^*$
V13	$1,66 \pm 4,08$	$1,66 \pm 4,08^*$
V18	$3,33 \pm 5,16$	$10,00 \pm 6,32$
V25	$13,33 \pm 19,66$	$5,00 \pm 8,36$
V32	$8,70 \pm 10,38$	$1,66 \pm 4,08^*$
V33	$16,01 \pm 29,35$	$3,33 \pm 5,16$
V34	$10,00 \pm 16,73$	$5,18 \pm 5,69$
V40	$12,59 \pm 17,59$	$0,00 \pm 0,00^*$

*Diferença significativa pelo teste de Dunnet ao nível de 10% de probabilidade.

Apesar da baixa taxa de mortalidade observada, as avaliações de expressão gênica relativa do gene *DcV-ATPase-A* sugerem que há o silenciamento parcial deste gene. Reduções significativas na expressão do gene *DcV-ATPase-A* foram observadas para eventos de plantas transgênicas V13 ($0,60 \pm 0,37$) e V33 ($0,67 \pm 0,12$), quando analisadas em tubo Falcon e tecido tunil, respectivamente (Figura 7).

Figura 7. Expressão relativa do gene *V-ATPase A* de *D. citri* alimentados em plantas de oito eventos transgênicos de laranja ‘Valência’ expressando ds-RNA do gene *DcV-ATPase-A* e acondicionados em gaiolas de tecido tunil e tubo Falcon e em condições ambiente e controlada (Temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h). Os dados correspondem à média de três replicatas biológicas e as barras representam o desvio padrão da média. (*) Diferença significativa pelo teste de Dunnet ao nível de 10% de probabilidade.

Plantas transgênicas do evento 33 apresentaram maior taxa de mortalidade dos insetos e maior silenciamento do gene *DcV-ATPase-A* para as avaliações em tecido tunil. Entretanto, o mesmo não ocorreu para o evento V13 em tubo Falcon, pois, apesar da redução significativa na expressão do gene, a porcentagem de mortalidade dos psilídeos foi inferior à das plantas testemunhas (Tabela 4 e Figura 7).

A análise da correlação entre a taxa de mortalidade e a expressão relativa do gene foi realizada através do coeficiente de Spearman. Para os experimentos de tecido tunil e tubo Falcon os resultados obtidos foram 0,15 ($p = 0,45$) e -0,07 ($p = 0,69$), respectivamente. Dessa forma, observa-se que para ambos experimentos não pode ser estabelecido uma relação entre taxa de mortalidade observada para adultos de *D. citri* com a redução na expressão relativa do gene *DcV-ATPase-A*.

Biologia de *D. citri* em plantas transgênicas

Diante dos resultados obtidos com a alimentação de adultos de *D. citri* em plantas transgênicas de laranja ‘Valência’, optou-se por selecionar alguns eventos transgênicos e

avaliar a biologia do inseto nos mesmos. Para este experimento, foram selecionados os eventos de plantas transgênicas V13, V18, V33, V34 e V40.

A biologia da *D. citri* foi realizada em duas épocas, primavera-verão e outono-inverno. Entretanto, não houve interação significativa entre as épocas e os tratamentos estudados para nenhuma das variáveis analisadas. Dessa forma, os dados obtidos para ambas as épocas foram apresentados de forma conjunta e desdobrados somente a nível de tratamento.

Para duração do ciclo, observou-se diferença significativa na fase ovo-adulto entre as plantas testemunha e as plantas transgênicas do evento V34, onde verificou-se redução de 1,78 dias de duração desta fase dos insetos. Para as plantas deste mesmo evento, houve diminuição de 0,46 dia na fase de ovo e 1,45 dias na fase ninfal. A redução na duração das fases foi maior na ninfal quando comparada ao estágio de ovo para todos os psilídeos que se desenvolveram nos eventos de plantas transgênicas, com exceção dos que foram colocados nas plantas do evento V40 (Tabela 5).

Tabela 5. Duração das fases de *D. citri* criados em plantas de cinco eventos transgênicos de laranja ‘Valência’ expressando ds-RNA do gene *DcV-APTase-A* (Temp. $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, U.R. $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14:10h (L:E)).

Tratamentos	Duração (dias)		
	Ovo	Ninfa	Total
Testemunha	$5,54 \pm 1,00$	$14,77 \pm 1,13$	$20,31 \pm 1,22$
V13	$5,31 \pm 0,88$	$14,34 \pm 0,93$	$19,65 \pm 1,32$
V18	$5,38 \pm 0,98$	$14,21 \pm 1,71$	$19,59 \pm 1,38$
V33	$5,40 \pm 0,93$	$14,45 \pm 1,92$	$19,85 \pm 1,93$
V34	$5,08 \pm 0,97$	$13,32 \pm 1,67$	$18,53 \pm 1,33^*$
V40	$4,75 \pm 0,48$	$15,63 \pm 1,35$	$20,35 \pm 1,19$

*Diferença significativa pelo teste de Dunnet ao nível de 10% de probabilidade.

Para a viabilidade do estágio de ovo, não foi constatada diferença significativa entre os tratamentos. Na fase ninfal, todos os psilídeos que se desenvolveram nos eventos de plantas transgênicas apresentaram menor viabilidade quando comparados aos que realizaram o ciclo em plantas testemunhas, sendo que para os eventos V34 e V40, a redução na porcentagem de ninfas viáveis foi significativa (Tabela 6). Para a viabilidade total do inseto, também foi observada redução na quantidade de ovos que se transformaram em adultos quando estes se desenvolveram nos eventos de plantas transgênicas. Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre os dados, enquanto 56% dos ovos colocados nas plantas

testemunhas atingiram a fase adulta, apenas 27% dos ovos colocados nas plantas do evento V34 sobreviveram até o final do ciclo (Tabela 6).

Tabela 6. Viabilidade e razão sexual de *D. citri* criados em plantas de cinco eventos transgênicos de laranja ‘Valência’ expressando ds-RNA do gene *DcV-ATPase-A* (Temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14:10h (L:E)).

Tratamentos	Viabilidade (%)			Razão Sexual***
	Ovo	Ninfa	Total**	
Testemunha	$99,10 \pm 2,25$	$56,83 \pm 18,59$	$56,17 \pm 18,02$	$0,62 \pm 0,09$
V13	$93,82 \pm 6,25$	$45,93 \pm 37,65$	$42,52 \pm 34,97$	$0,75 \pm 0,18$
V18	$99,37 \pm 1,76$	$30,36 \pm 21,40$	$30,26 \pm 21,48$	$0,62 \pm 0,28$
V33	$96,25 \pm 7,01$	$49,87 \pm 34,63$	$48,76 \pm 34,97$	$0,48 \pm 0,16$
V34	$99,64 \pm 1,01$	$23,79 \pm 18,05^*$	$27,13 \pm 16,56$	$0,56 \pm 0,25$
V40	$92,40 \pm 9,93$	$27,17 \pm 25,71^*$	$28,35 \pm 22,80$	$0,67 \pm 0,29$

*Diferença significativa pelo teste de Dunnet ao nível de 10% de probabilidade.

** Relação entre a viabilidade do ovo e da fase ninfal : $(V_{\text{ovo}} \times V_{\text{ninfa}})/100$.

*** Número de fêmeas / (número de machos + número de fêmeas)

Não foi verificada interferência dos eventos de plantas transgênicas na razão sexual dos psilídeos. Para todos os tratamentos, houve predominância de fêmeas, evidenciando que não houve alteração no potencial de reprodução dos insetos (Tabela 6).

A análise de expressão relativa do gene *DcV-ATPase-A* realizada com os psilídeos adultos coletados, aproximadamente, 24 horas após a emergência e que se desenvolveram nas plantas transgênicas, sugerem que há redução na expressão deste gene, apesar de não ser significativa estatisticamente (Figura 8).

As maiores reduções na expressão relativa do gene *DcV-ATPase-A* foram observados nos insetos que se desenvolveram nas plantas transgênicas V33 ($0,83 \pm 0,13$) e V40 ($0,83 \pm 0,18$) (Figura 8). O evento transgênico V34, apesar de apresentar reduções significativas na duração total do ciclo e na sobrevivência ninfal dos insetos, apresentou pouca alteração na expressão relativa deste gene para os psilídeos adultos ($0,96 \pm 0,15$) (Figura 8).

Figura 8. Expressão relativa do gene *V-ATPase A* de adultos recém emergidos de *D. citri* criados em plantas de cinco eventos transgênicos de laranja ‘Valência’ expressando ds-RNA do gene *DcV-ATPase-A* (Temp. $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, U.R. $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14:10h (L:E)). Os dados correspondem à média de três replicatas biológicas e as barras representam o desvio padrão da média.

A análise da longevidade dos psilídeos criados nos eventos de plantas transgênicas mostrou uma redução no tempo vida de *D. citri*. Não foi observada diferença para esta variável quando comparados machos e fêmeas (Tabela 7).

Os resultados obtidos para os psilídeos, independentemente da separação por sexo, mostraram que os adultos criados nas plantas testemunhas apresentaram duração média de 36 dias, enquanto que nas plantas transgênicas a maior longevidade média foi de 29 dias para o evento V34, o que corresponde a uma redução de 7 dias de vida dos psilídeos em relação à testemunha (Tabela 7).

Psilídeos criados nos eventos de plantas transgênicas V18 e V33 tiveram diminuição de sua longevidade em 21 e 18 dias, respectivamente, quando comparados à testemunha (Tabela 7).

Tabela 7. Longevidade de machos e fêmeas de *D. citri* criados em plantas de cinco eventos transgênicos de laranja ‘Valência’ expressando ds-RNA do gene *DcV-ATPase-A* (Temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14:10h (L:E)).

Tratamentos	Duração (dias)		
	Macho	Fêmea	Casal
Testemunha	$38,66 \pm 10,96$	$35,00 \pm 13,89$	$36,80 \pm 11,37$
V13	$19,50 \pm 19,09$	$18,50 \pm 17,67$	$19,00 \pm 15,03$
V18	$15,50 \pm 14,84$	$15,00 \pm 15,55$	$15,25 \pm 12,41^*$
V33	$21,33 \pm 5,68$	$16,33 \pm 3,21$	$18,83 \pm 4,45^*$
V34	$28,00 \pm 5,29$	$30,33 \pm 8,50$	$29,16 \pm 6,46$
V40	$27,33 \pm 20,84$	$21,00 \pm 11,26$	$24,16 \pm 15,38$
Média	26,00 A	23,43 A	24,21

*Diferença significativa pelo teste de Dunnet ao nível de 10% de probabilidade. As letras maiúsculas entre colunas correspondem a diferença significativa pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade.

4.4. Discussão

Os avanços obtidos no segmento da biotecnologia vêm contribuindo muito para a área de resistência de plantas a insetos. A identificação de genes, a caracterização de suas funções, a clonagem, a introdução específica de genes de interesse na planta, o controle do nível de expressão gênica e a possibilidade de detecção da expressão antes mesmo do completo desenvolvimento da planta gerou uma grande revolução na forma de obtenção e avaliação de cultivares resistentes a insetos (Vendramim; Guzzo, 2012). A técnica do silenciamento gênico por RNAi é mais uma ferramenta biotecnológica que apresenta potencial para o controle de pragas em uma ampla variedade de plantas (Huvenne; Smaghe, 2010).

A utilização de plantas transgênicas que expressam o dsRNA tem sido considerada uma alternativa promissora na proteção de plantas, com benefícios sobre o controle químico e biológico, pois, a especificidade da sequência do RNAi permite que espécies individuais e ordens específicas de pragas sejam controladas seletivamente (Kim et al., 2015; Price; Gatehouse, 2008; Whyard et al., 2009). A técnica de entrega do dsRNA através de plantas transgênicas pode causar uma ampla gama de efeitos adversos na fisiologia do inseto, desde problemas de desenvolvimento até a morte (Huang et al., 2006; Baum et al., 2007; Mao et al., 2007). Experiências bem sucedidas de controle de pragas de importância agrícola através de RNAi mediada por plantas têm sido relatadas, porém, diferenças entre a eficiência desta ferramenta foram observadas entre experimentos e laboratórios (Christiaens; Smaghe, 2014; Katoch et al., 2013).

Os psílídeos (Hemiptera: Liviidae) se alimentam exclusivamente no floema, dentre eles, *D. citri* é tido como o mais importante para a citricultura mundial devido à transmissão das bactérias associadas ao HLB. Culturas transgênicas que expressam toxinas derivadas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) têm proporcionado proteção vegetal eficaz contra algumas pragas; entretanto, as toxinas Bt têm pouca toxicidade contra insetos sugadores de seiva (Chougulel; Bonning, 2012).

Plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ produzidas por Silva (2013) com uma construção gênica do tipo *hairpin* de um fragmento de 206 pb do gene da *DcV-ATPase-A*, foram avaliadas quanto à sua eficiência em promover o silenciamento deste gene em *D. citri*, através da alimentação destes nas plantas transgênicas. A análise de Southern blot confirmou a integração estável desta construção gênica no genoma da cultivar transformada e como cada planta transgênica apresentou diferentes padrões de integração, foram consideradas provenientes de diferentes eventos de transformação. O número de cópias do transgene inseridas no genoma das plantas transgênicas variou de 1 a 4. A comprovação da produção de siRNAs pelas plantas transformadas foi realizada através da análise de siRNA blot (Silva, 2013). O promotor constitutivo CaMV 35S foi utilizado com o objetivo de garantir a expressão da construção em todas as células da planta, inclusive nas células companheiras dos vasos floemáticos garantindo assim uma produção e abastecimento contínuo de dsRNA no floema (Yang; Christou, 1990; Johansen; Carrington, 2001).

Os bioensaios realizados com os psílídeos adultos mostraram que as plantas transgênicas causaram o silenciamento significativo do gene *DcV-ATPase-A* para os eventos V13 (40%) e V33 (33%). Entretanto, esse efeito não foi suficiente para causar a mortalidade dos insetos. Estes resultados podem estar relacionados ao estágio de desenvolvimento dos insetos, pois diversos trabalhos têm relatado que o efeito do RNAi é mais proeminente nas fases iniciais quando comparado aos estádios tardios (Katoch et al., 2013). Trabalho realizado com injeção de dsRNA em *Spodoptera frugiperda* sugere que o silenciamento foi maior em larvas de quinto ínstar em comparação às mariposas adultas (Griebler et al., 2008). Em *Rhodnius prolixus*, utilizando a mesma concentração de dsRNA, o silenciamento do gene *nitropin 2* foi de 42% em ninfas de segundo instar enquanto nenhum silenciamento foi detectado em ninfas de quarto instar (Araújo et al., 2006).

A baixa mortalidade dos insetos também pode estar relacionada ao fato do gene silenciado pertencer a família de genes múltiplos, em que outros membros podem compensar a supressão de um membro (Zha et al., 2011). As V-ATPases estão envolvidas em mecanismos celulares básicos e são componentes essenciais praticamente em todas as células

eucarióticas, pois, o funcionamento normal do complexo de Golgi, retículo endoplasmático, vacúolos e vesículas endocitóticas e exocitóticas dependem da ação desta enzima. Dessa forma, pode ocorrer de mais de um gene codificar uma subunidade da V-ATPase e, quando isso ocorre, diferentes isoformas de subunidades são usualmente encontradas em locais diferentes (Beyenbach; Wieczorek, 2006). Trabalho realizado com leveduras verificou que uma das duas isoformas da subunidade A é direcionada para a membrana vacuolar, enquanto que a segunda isoforma é direcionada para o aparelho de Golgi (Kawasaki-Nishi et al., 2001). Estudos realizados com *Nilaparvata lugens* revelaram a presença de uma múltipla família de genes que codificam proteases digestivas e associaram este fato a facilidades de adaptação de sugadores de floema a diferentes variedades de arroz (Yang et al., 2010).

A ausência de fenótipo letal utilizando a técnica de RNAi através de plantas transgênicas também foi relatada por Mao; Zeng (2014) ao desenvolver plantas de tabaco expressando o dsRNA do gene *hunchback* do pulgão *Myzus persicae*. Neste trabalho, os autores observaram silenciamento de 31,3% do gene, após ninfas de primeiro ínstar se alimentarem por sete dias nas plantas. Entretanto, não foi verificada nenhuma diferença estatística na sobrevivência dos insetos naquele mesmo período. Estudo realizado com *Nilaparvata lugens* com a ingestão de plantas de arroz transgênicas que produzem dsRNA dos genes *NIHT1*, *Nlcar* e *Nltry* revelou a supressão da expressão dos três genes, sendo observado um silenciamento de 40% a 70%. Entretanto, os autores também relataram a ausência de fenótipo letal (Zha et al., 2011). Plantas transgênicas de tabaco expressando dsRNA específico para *MjTis11*, um fator de transcrição do nematóide de raiz *Meloidogyne javanica*, também resultou em silenciamento do gene e nenhuma alteração significativa na sobrevivência dos nematóides (Fairbairn et al., 2007).

Resultados contrários aos obtidos no presente trabalho foram observados para *Bemisia tabaci* alimentadas em plantas de tabaco expressando o dsRNA do gene *V-ATPase A*. Neste estudo, os autores verificaram 62% de silenciamento do gene e mortalidade de até 83% dos insetos que se alimentaram nas plantas transgênicas por 6 dias (Thakur et al., 2014). Hajeri et al. (2014), através do silenciamento gênico induzido por vírus (“*virus-induced gene silencing*” – VIGS) também observaram aumento na mortalidade e má formação na asa dos psilídeos através do silenciamento do gene *Awd*, responsável pelo fenótipo da asa de *D. citri*.

Uma vez que alterações genéticas numa isoforma específica das V-ATPases não necessariamente resultam em um fenótipo letal, mas podem originar distúrbios hereditários (Beyenbach; Wieczorek, 2006), optou-se por realizar estudos sobre a biologia de *D. citri* nas plantas transgênicas de laranja doce, pois, os resultados de redução significativa na expressão

do gene *DcV-ATPase-A* demonstraram a presença de um sistema para a captação de dsRNA e o potencial de silenciamento do gene alvo através do RNAi. Nos bioensaios em que estudou-se a biologia dos psilídeos nas plantas transgênicas foram avaliados a duração e a sobrevivência das fases de ovo, ninfa e ovo-adulto, a razão sexual, a longevidade e a expressão relativa do gene *DcV-ATPase-A*.

Para a variável duração das fases de desenvolvimento observou-se redução das fases ovo, ninfa e total, para todos os insetos que se alimentaram nas plantas transgênicas, entretanto, somente o evento V34 apresentou diferença significativa para a fase total em relação às plantas testemunhas. Alterações no tempo de desenvolvimento entre as fases dos insetos podem estar relacionadas às alterações na fisiologia do inseto, em função da ingestão de compostos tóxicos ou metabólicos secundários, ou até mesmo pela qualidade nutricional do hospedeiro (Setámou et al., 1999; Awmack; Leather, 2002; Vendramim; Guzzo, 2012). No presente estudo, a ingestão de moléculas de dsRNA pode ter causado alterações fisiológicas nos psilídeos que resultaram na redução da duração das fases estudadas. Trabalho realizado por Mao et al. (2007) observou que larvas de *Hilicoverpa armigera* que se alimentaram em plantas transgênicas produzindo dsRNA do gene *CYP6AE14* apresentaram um tempo de desenvolvimento prolongado.

Neste trabalho, a sobrevivência dos psilídeos foi reduzida pela alimentação em plantas transgênicas produzindo moléculas de dsRNA do gene *DcV-ATPase-A*. Os eventos V34 e V40 apresentaram mortalidade de 76 e 73%, respectivamente, para a fase ninfal. Os resultados obtidos no presente estudo para *D. citri* confirmam a maior eficiência do efeito do RNAi nas fases iniciais em relação aos estádios tardios (Katoch et al., 2013). Estudo de biologia da cochonilha *Planococcus citri* realizados em plantas de tabaco produzindo dsRNA dos genes da *V-ATPase* e *quitina sintase I (CHSI)*, também mostraram redução na viabilidade ninfal, assim como na viabilidade total desses insetos. A mortalidade das cochonilhas que foram transferidas para as plantas expressando o dsRNA foi menor quando comparadas à ninfas provenientes da oviposição nestas plantas. Os autores relatam ainda que a oviposição dos adultos alimentados em plantas expressando o dsRNA foi menor em relação aos alimentados nas plantas controle (Khan et al., 2013).

Ensaio com o psilídeo da batata *Bactericera cockerelli* também relatou melhor efeito do RNAi quando as ninfas se alimentaram de discos foliares produzindo moléculas de dsRNA (Wuriyangan; Falk, 2013). Os resultados apresentados sugerem a maior suscetibilidade das ninfas ao mecanismo de RNAi. Esta resposta pode estar relacionada ao comportamento alimentar voraz das mesmas, por se encontrarem em desenvolvimento quando comparada a

insetos adultos mais velhos. Dessa forma, as ninfas podem absorver maiores quantidades de dsRNA/siRNA em comparação com psilídeos adultos, potencializando o efeito do RNAi (Khan et al., 2013).

A análise de expressão relativa do gene *Dc-VATPase-A* realizada no psilídeo adulto, 24 horas após a emergência, não mostrou silenciamento significativo do gene para nenhum dos eventos de plantas transgênicas. Este resultado pode ter ocorrido devido ao período de coleta do inseto para análise, pois, os psilídeos analisados correspondem às ninfas que foram capazes de sobreviver à condição imposta pelas plantas transgênicas.

Uma hipótese é que os insetos sobreviventes podem ter realizado alterações de processos fisiológicos e bioquímicos, visando garantir sua sobrevivência diante de um ambiente estressante. Essa suposição pode ter relação com o fenômeno conhecido por hormese, o qual corresponde a um modelo bifásico caracterizado por estimulação a dose baixa e inibição a altas doses (Calabrese, 2005a; Calabrese, 2005b; Calabrese, 2010). A hormese já foi detectada em organismos unicelulares e multicelulares, e para medidas biológicas, como crescimento, longevidade, diversos processos metabólicos e moleculares, função cognitiva e resposta imune (Calabrese; Baldwin, 2003a; Calabrese; Baldwin, 2003b; Calabrese; Blain, 2005). Os efeitos do processo de hormese não se limitam somente a estresses químicos, tais como pesticidas e metais pesados, mas podem manifestar-se após um leve estresse de temperatura (Stolzing et al., 2006, Galbadage; Hartman, 2008, Gomez et al. 2009), a diminuição da ingestão calórica ou do exercício (Le Bourg; Rattan, 2008; Mattson; Calabrese, 2010), e a radiação induzida (Azzam et al., 1996).

Segundo Forbes (2000), o processo de hormese resulta em uma temporária realocação de recursos, que é seguida por alguma alteração mensurável em outro processo biológico do inseto. Tal fenômeno pode estar associado aos resultados observados neste trabalho de redução da longevidade dos psilídeos adultos que se desenvolveram nas plantas transgênicas. Apesar de somente os insetos alimentados nos eventos V13 e V18 terem apresentado diminuições significativas da longevidade, todos os psilídeos que tiveram seu ciclo biológico realizado nas plantas transgênicas viveram menos em relação aos da planta testemunha. Trabalho realizado por Sial; Brunner (2010) evidenciaram este processo verificando que embora as pupas e os pesos de adultos de *Choristoneura rosaceana* tenham aumentado significativamente após a exposição larval a concentrações subletais de piriproxifeno, a fecundidade e fertilidade subsequentes do inseto foram reduzidas nas doses aplicadas.

Portanto, apesar do psilídeo *D. citri* se desenvolver até a fase adulta nas plantas transgênicas, apresentando pouco silenciamento do gene logo após seu processo de transformação de ninfa para adulto, o mesmo não foi capaz de sobreviver se alimentando nestas plantas por tempo semelhante ao inseto que realizou seu ciclo biológico nas plantas testemunhas. É possível que a realocação temporária de recursos, decorrentes do processo hormese, visando a sobrevivência, tenha causado redução da duração da fase ovo-adulto assim como da longevidade dos psilídeos.

Diante do apresentado, observa-se que a eficiência do sistema de silenciamento gênico por RNAi através da ingestão de dsRNA varia entre espécies diferentes. Essa variabilidade nos resultados obtidos pode ser relacionada a dificuldade de quantificação da molécula de dsRNA que é internalizada pelo inseto quando administrada por via oral (Surakasi et al., 2011). Além disso, as diferentes espécies de insetos apresentam sensibilidades distintas para as moléculas de RNAi quando fornecidas por via oral (Katoch et al., 2013). Trabalho realizado com *G. morsitans* alimentados com dsRNA do gene *TsetseEP* mostrou que as moléculas internalizadas foram capazes de inibir eficazmente a expressão deste gene no intestino médio. Entretanto, dsRNAs do gene *transferrina 2A192* não reduziram a expressão do gene de em células de gordura em função da baixa capacidade de transferência entre tecidos (Walshe et al., 2009).

Outra hipótese para essa variabilidade nos efeitos do silenciamento gênico por RNAi através da administração oral de dsRNA é a degradação desta molécula pelo inseto, que já foi observada ocorrendo no intestino ou nas secreções salivares de diferentes espécies (Christiaens et al., 2014; Allen; Walker, 2012; Wynant et al., 2014). Duas propostas para essa possível degradação do dsRNA são: ou o dsRNA é instável a um determinado pH nos tecidos específicos do inseto e/ou dsRNases estão presentes no sistema digestivo dos insetos (Christiaens; Smaghe, 2014). A primeira hipótese é fundamentada no fato de que a faixa de pH do intestino de hemípteras pode variar entre as condições ácidas e alcalinas, dependendo da localização no intestino, e o dsRNA é instável em condições muito alcalinas (Christiaens; Smaghe, 2014). Além disso, estudos têm demonstrado a presença de nucleases degradantes de dsRNA (dsRNases) em afídeos. Trabalho realizado com o pulgão *Acyrtosiphon pisum* identificou duas dsRNases similares, o que pode contribuir para a falta de resposta silenciadora, por vezes observada neste pulgão (Christiaens et al., 2014). Para o gafanhoto do deserto *Schistocerca gregaria*, também foi identificada uma dsRNase de DNA/RNA não específica, que é capaz de degradar rapidamente dsRNA no intestino, resultando em menor

sensibilidade a RNAi via administração oral de dsRNA em comparação com microinjeção (Wynant et al., 2014).

O sucesso do manejo de pragas utilizando a tecnologia de plantas transgênicas expressando dsRNA depende de vários fatores como: seleção do gene alvo, o região mais eficaz dentro do gene para silenciamento, o comprimento da sequência de nucleotídeos alvo, a minimização dos efeitos fora do alvo, as suscetibilidades relativas de diferentes estádios de desenvolvimento do inseto, a produção de dsRNA em plantas transgênicas, o mecanismo de captação da molécula RNAi e se e como o sinal RNAi é amplificado e disseminado entre as células dos afídeos, a persistência dos efeitos do RNAi, a degradação do dsRNA pelas dsRNases nas células dos insetos e a avaliação da possibilidade de desenvolvimento de resistência dos insetos à esta tecnologia (Joga et al., 2016; Yu et al., 2016).

A utilização de plantas transgênicas expressando dsRNA tem demonstrado redução nos danos à cultura. Entretanto, a redução efetiva da população de pragas ainda não foi alcançada (Baum et al., 2007; Mao et al., 2007; Pitino et al., 2011; Kumar et al., 2012; Zhu et al., 2012). Os resultados obtidos demonstraram a internalização pelo inseto das moléculas de dsRNA/siRNA produzidos pelas plantas transgênicas e o potencial de redução da expressão do gene alvo pelo RNAi. Apesar da ausência de fenótipo letal em psílídeos adultos alimentados nas plantas transgênicas, alterações significativas na duração, sobrevivência e longevidade foram verificadas em *D. citri* quando esta desenvolveu seu ciclo biológico nas plantas que produzem dsRNA do gene *DcVAPTase-A*. A redução da sobrevivência e longevidade dos psílídeos podem contribuir para o manejo do HLB nos pomares de citros através da redução na disseminação de Clas e Clam.

Referências

- ALLAN, A.K.; DU, J.; DAVIES, S.A.; DO, J.A.T. Genome-wide survey of V-ATPase genes in *Drosophila* reveals a conserved renal phenotype for lethal alleles. **Physiological Genomics**, Rockville, v. 22, p. 128-138, 2005.
- ALLEN, M.L.; WALKER, W.B. Saliva of *Lygus lineolaris* digests double stranded ribonucleic acids. **Journal of Insect Physiology**, v.58, p.391–396, 2012.
- AMMAR, E.D; WALTER, A.J.; HALL, D.G. New Excised-Leaf Assay Method to Test Inoculativity of Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae) with Candidatus *Liberibacter Asiaticus* Associated with Citrus Huanglongbing Diseases, **Journal of Economic Entomology**, v. 106, p. 25-35, 2013.

- ARAUJO, R. N.; SANTOS, A.; PINTO, F. S.; GONTIJO, N. F.; LEHANE, M. J.; PEREIRA, M. H. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 683–693, 2006.
- AWMACK, C.S.; LEATHER, S.R. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 817-844, 2002.
- AZZAM, E.I.; DE TOLEDO, S.M.; RAAPHORST, G.P.; MITCHEL, R.E.J. Low-dose ionizing radiation decreases the frequency of neoplastic transformation to a level below the spontaneous rate in C3H 10T1/2 cells. **Radiation Research**, v.146, p. 369-373, 1996.
- BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; BUSATO, L.A.; STUCHI, E.S. Damages caused by huanglongbing on sweet orange yield and quality in São Paulo. Proceedings of the Huanglongbing-Greening International Workshop. Ribeirão Preto SP, p. 39, 2006.
- BAUM, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, n. 11, p. 1322-1326, 2007.
- BELASQUE JÚNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R.B.; BARBOSA, J.C.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; MACHADO, M.A.; LEITE JUNIOR, R.P.; AYRES, A.J.; MASSARI, C.A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*, Brasília, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.
- BEYENBACH, K.W.; WIECZOREK, H. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 209, p. 577-589, 2006.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 88 n. 1, p. 7-37, 2006.
- CALABRESE, E.J.; BALDWIN, L.A. The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 71, p. 246-250, 2003a.
- CALABRESE, E.J.; BALDWIN, L.A. Toxicology rethinks its central belief. **Nature**, v. 421, p. 691-692, 2003b.
- CALABRESE, E.J.; BLAIN, R. The occurrence of hormetic dose response in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 202, p. 289-301, 2005.
- CALABRESE, E.J. Toxicological awakenings: the rebirth of hormesis as a central pillar of toxicology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, p. 1-8, 2005a.

- CALABRESE, E.J. Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. **Environmental Pollution**, v. 138, p. 378-411, 2005b.
- CALABRESE, E.J. Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment. **Human & Experimental Toxicology**, v. 29, p. 249-261, 2010.
- CIPRIANO, D.J.; WANG, Y.; BOND, S.; HINTON, A.; JEFFERIES, K.C.; QI, J.; FORGAC, M. Structure and regulation of the vacuolar ATPases. **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1777, p. 599-604, 2008.
- COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br>>. Acesso em: 10 dez, 2016.
- CHOUGULE, N.P.; BONNING, B.C. Toxins for transgenic resistance to Hemipteran pests. **Toxins**, v. 4, p. 405–429, 2012.
- 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.
- 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, 2013.
- FAGARD, M.; BOUTET, S.; MOREL, J.B.; BELLINI, C.; VAUCHERET, H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 21, p. 11650–11654 Oct. 2000.
- FAIRBAIRN, D.J.; CAVALLARO, A.S.; BERNARD, M.; MAHALINGA-IYER, J.; GRAHAM, M.W.; BOTELLA, J.R. Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. **Planta**, v. 226, p.1525–1533, 2007.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO **Agrianual 2016**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: Editora FNP, 2016. 456 p.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 10 Dez, 2016.
- FORBES, V.E. Is hormesis an evolutionary expectation? **Functional Ecology**, v.14, p. 12-24, 2000.
- GALBADAGE, T.; HARTMAN, P.S. Repeated temperature fluctuation extends the life span of *Caenorhabditis elegans* in a daf-16-dependent fashion. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, p. 507-514, 2008.

- GOMEZ, F.H.; BERTOLI, C.I.; SAMBUCETTI, P.; SCANNAPIECO, A.C.; NORRY, F.M. Heat-induced hormesis in longevity as correlated response to thermal-stress selection in *Drosophila buzzatii*. **Journal of Thermal Biology**, v. 34, p. 17-22, 2009.
- GOTTWALD, T.R.; DA GRAÇA, J.V.; BASSANEZI, R.B. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, 2007, Online (doi: 10.1094/PHP-2007-0906-01- RV).
- GRIEBLER, M.; WESTERLUND, S. A.; HOFFMANN, K. H.; MEYERRING-VOS, M. RNA interference with the allatoregulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p. 997–1007, 2008.
- GU, L.; KNIPPLE, D.C. Recent advances in RNA interference research in insects: implications for future insect pest management strategies. **Crop Protection**, Guildford, v. 45, p. 36-40, 2013.
- HAJERI, S.; KILLINY, N.; EL-MOHTARA, C.; DAWSONA, W.O.; GOWDAA, S. Citrus tristeza virus-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). **Journal of Biotechnology**, v. 176, p. 42–49, 2014.
- HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 87, p. 330-353, 2004.
- HUANG, G.; ALLEN, R.; DAVIS, E.L.; BAUM, T.J.; HUSSEY, R.S. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 14302-14306, 2006.
- 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, p.227-235, 2010.
- JAGOEIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 44, n. 3, p. 379-386, 1994.
- JEFFERIES, K.C.; CIPRIANO, D.J.; FORGAC, M. Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 476, p. 33-42, 2008.
- JOHANSEN, L.K.; CARRINGTON, J.C. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. **Plant Physiology**, v. 126, p. 930–938, 2001.
- JOGA, M.R.; MOISES J. ZOTTI, M.J.; SMAGGHE, G.; CHRISTIAENS, O. RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 1-14, 2016.

- KHAN, A.M.; ASHFAQ, M.; KISS, Z.; KHAN, A.A.; MANSOOR, S.; FALK, B.W. Use of recombinant tobacco mosaic virus to achieve RNA interference in plants against the citrus mealybug, *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae). **PLoS ONE** 8(9): e73657. doi:10.1371/journal.pone.0073657, 2013.
- KATOCH, R.; SETHI, A.; THAKUR, N.; MURDOCK, L.L. RNAi for insect control: current perspective and future challenges. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 171, n. 4, p. 847-873, 2013.
- KAWASAKI-NISHI, S.; BOWERS, K.; NISHI, T.; FORGAC, M.; STEVENS, T. H. The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 47411-47420, 2001.
- KIM, Y.H.; ISSA, M.S.; COOPER, A.M.; ZHU, K.Y. RNA interference: applications and advances in insect toxicology and insect pest management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.120, p.109–117, 2015.
- KUMAR, P.; PANDIT, S. S.; BALDWIN, I. T. Tobacco rattle virus vector: a rapid and transient means of silencing *Manduca sexta* genes by plant mediated RNA interference. **PLoS ONE**, 7:e31347. doi: 10.1371/journal.pone.0031347, 2012.
- LE BOURG, E.; RATTAN, S.I.S. **Mild Stress and Healthy Aging: Applying Hormesis in Aging Research and Interventions**. Springer, New York, 2008.
- LI, J.; CHEN, Q.; LIN, Y. JIANG, T.; WUA, G.; HUA, H. RNA interference in *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) based on dsRNA ingestion. *Pest Management Science* v.67, p. 852–859, 2011.
- LI, X.X.; ZHANG, M.Y.; ZHANG, H.Y. RNA Interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. **Plos One**, v. 6, n. 3, 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**, New York, v. 25, n. 11, p. 1307-1313, 2007.
- MAO, Y.B.; TAO, X.Y.; XUE, X.Y.; WANG, L.J.; CHEN, X.Y. Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 20, n. 3, p. 665-673, 2011.
- MAO, J.; ZENG, F. Plant-mediated RNAi of a gap gene-enhanced tobacco tolerance against the *Myzus persicae*, **Transgenic Research**, v. 23, p.145–152, 2014.
- MARUTANI-HERT, M.; HUNTER, W.B.; KATSAR, C.S.; SINISTERRA, X.H.; HALL, D.G.; POWELL, C.A. Reovirus-like sequences isolated from adult Asian citrus psyllid, (Hemiptera: Psyllidae: Diaphorina citri). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 92, n. 2, p. 314-320, 2009.

- MATTSON, M.P.; CALABRESE, E.J. **Hormesis: A Revolution in Biology, Toxicology and Medicine**. Springer, New York, 2010.
- MELLO, C.C., CONTE JR., D., Revealing the world of RNA interference. **Nature**, v. 431, p. 338-342, 2004.
- PARRA, J. R. P., ALVES, G. R., DINIZ, A. J. F., VIEIRA, J. M. *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) × *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): Mass Rearing and Potential Use of the Parasitoid in Brazil. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 7, p.1-11, 2016.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2003-2007, 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**, 6:e25709. doi: 10.1371/journal.pone.0025709, 2011.
- PRICE, D.R.G.; GATEHOUSE, J.A. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 393-400, 2008.
- SÉTAMOU, M.; SCHULTHESS, F.; BOSQUE-PÉREZ, N.A.; POEHLING, H-M.; BORGEMEISTER, C. Bionomics of *Mussidia nigrivenella* (Lepidoptera: Pyralidae) on three host plants. **Bulletin of entomological research**. v. 89, p. 465-471, 1999.
- SIAL, A.A.; BRUNNER, J.F. Lethal and sublethal effects of an insect growth regulator, pyriproxyfen, on obliquebanded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Economic Entomology** , v. 103, p. 340-347, 2010.
- SIOMI, H.; SIOMI, M.C. On the road to Reading the RNA-interference code. **Nature**, v.457, p.396–404, 2009.
- SILVA, T.L. **Transformação genética de laranja doce com uma construção gênica do tipo hairpin de um fragmento do gene da V-ATPase-A de *Diaphorina citri* Kuwayama**, 2013. 85p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- SOARES FILHO, W.S.; MEDRADO, A.C.M.; CUNHA, M.A.P.; SOBRINHO, A.P.C.; PASSOS, O.S. Frequência de híbridos em cruzamentos controlados de citrus: cultivo de sementes versus cultivo in vitro de embriões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p. 981-988, 2002.
- STOLZING, A.; SETHE, S.; SCUTT, A.M. Stressed stem cells: Temperature response in aged mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 15, p. 478-487, 2006.
- STUCHI, E.S.; GIRARDI, E.A. **Use of horticultural practices in citriculture to survive huanglongbing**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010. 71 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 189), 2010.

- SURAKASI, V. P.; MOHAMED, A. A. M.; KIM, Y. RNA interference of beta 1 integrin subunit impairs development and immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, 57, 1537–1544, 2011.
- 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, 2014.
- TIAN, H.G.; PENG, H.; YAO, Q.; CHEN, H.X.; XIE, Q.; TANG, B.; ZHANG, W.Q. Developmental control of a Lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. **PloS One**, v. 4, n. 7, July 2009.
- TOMOYASU, Y.; MILLER, S.C.; TOMITA, S.; SCHOPPMER, M.; GROSSMANN, D.; BUCHER, G. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. **Genome Biology**, v.9, p.10, 2008.
- UPADHYAY, S.K.; CHANDRASHEKAR, K.; THAKUR, N.; VERMA, P.C.; BORGIO, J.F.; SINGH, P.K.; TULI, R. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 36, n. 1, p. 153-161, 2011.
- USDA (2015) Citrus: November Forecast. Disponível em: http://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Florida/Publications/Citrus. Acesso em: 10 Dez, 2016.
- VENDRAMIM, J.D.; GUZZO, E.C. Plant resistance and insect bioecology and nutrition. In: PANIZZU, A.R. PARRA, J.R.P. (ed) **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. CRC, Boca Raton, p.657-686, 2012.
- WALSHE, D. P.; LEHANE, S. M.; LEHANE, M. J.; HAINES, L. R. Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. **Insect Molecular Biology**, v.18, p. 11–19, 2009.
- WHYARD, S.; SINGH, A.D.; WONG, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p.824–832, 2009.
- WURIYANGHAN, H.; ROSA, C.; FALK, B.W. Oral delivery of double-stranded RNAs and siRNAs induces RNAi effects in the potato/tomato psyllid, *Bactericera cockerelli*. **PloS One**, v. 6, 2011.
- WURIYANGHAN, H.; FALK, B.W. RNA interference towards the potato psyllid, *Bactericera cockerelli*, is induced in plants infected with recombinant Tobacco mosaic virus (TMV). **PLoS ONE** 8(6): e66050, 2013.
- WYNANT, N.; SANTOS, D.; VERDONCK, R.; SPIT, J.; VAN WIELENDAELE, P.; VANDEN BROECK, J. Identification, functional characterization and phylogenetic analysis of double stranded RNA degrading enzymes. **Biochemistry and Molecular Biology**, v.46, p.1–8, 2014.

- YANG, J.; HAN, Z.J. Optimisation of RNA interference-mediated gene silencing in *Helicoverpa armigera*. **Austral Entomology**, v.53, p.83–88, 2014.
- YANG, N.S.; CHRISTOU, P. Cell type specific expression of a CAMV 35S-GUS gene in transgenic Soybean plants. **Developmental Genetics**, v.11, p. 289–293, 1990.
- YANG, Z.; XIA, X.; WANG, X.; HE, G. cDNA cloning, heterogeneous expression and biochemical characterization of a novel trypsin-like protease from *Nilaparvata lugens*. **Z Naturforsch C**, v. 65, p. 109–118, 2010.
- YU, X.D.; LIU, Z.C.; HUANG, S.L.; CHEN, Z.Q.; SUN, Y.W.; DUAN, P.F.; MA, Y.Z.; XIA, L.Q. RNAi-mediated plant protection against aphids. **Pest Management Science**, v.72, p. 1090-1098, 2016.
- ZHA, W.; PENG, X.; CHEN, R.; DU, B.; ZHU, L.; HE, G. Knockdown of Midgut Genes by dsRNA-Transgenic Plant-Mediated RNA Interference in the Hemipteran Insect *Nilaparvata lugens*, **PLoS ONE** 6(5): e20504. doi:10.1371/journal.pone.0020504, 2011.
- ZHU, J. Q.; LIU, S.; MA, Y.; ZHANG, J. Q.; QI, H. S.; WEI, Z. J.; YAO, Q.; ZHANG, W.Q.; LI, S. Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsRNA of an insect-associated gene EcR. **PLoS ONE**, 7:e38572. doi: 10.1371/journal.pone.0038572, 2012.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica da proteção de plantas a pragas agrícolas tem se apresentado como uma alternativa ao método químico em função de vantagens em relação ao uso convencional de inseticidas como, por exemplo, não provoca poluição ambiental, não causa intoxicação dos operadores, não deixa resíduos nos alimentos, tem ação contínua sobre os insetos, é compatível com outros métodos de controle e é passível de ser incorporada em programas de manejo integrado de pragas.

A utilização do sistema de supressão gênica dependente da sequência de RNAi mediado por plantas surgiu como uma alternativa promissora na proteção de plantas contra insetos, através de um modo de ação único e com maior potencial para adaptar a especificidade, em relação às pequenas moléculas de inseticida. A seletividade desta tecnologia está na natureza específica de sequência de RNAi, a qual permite que espécies individuais de insetos sejam seletivamente controladas. Além disso, esse sistema dispensa a necessidade das proteínas-alvo apresentarem canais e sítios específicos para a ligação das moléculas.

Entretanto, o sucesso desta tecnologia exige amplo conhecimento sobre ferramentas de análises moleculares, fisiologia e bioquímica de insetos e aspectos da interação de insetos com as plantas. O estabelecimento de genes de referência adequados para as condições experimentais utilizada é essencial para a quantificação do silenciamento gênico que pode vir a ocorrer no inseto através da alimentação em plantas produzindo dsRNA. Os resultados demonstrados neste trabalho confirmaram a importância da escolha do gene de referência para cada condição experimental utilizada, uma vez que a estabilidade de expressão gênica varia entre as diferentes ordens de inseto, dentro da mesma ordem e até mesmo entre os diferentes estágios de desenvolvimento de uma mesma espécie.

O estudo da biologia, fisiologia e bioquímica dos insetos permite que os bioensaios sejam delineados adequadamente para que seja possível explorar as diversas respostas que os insetos podem fornecer em função da sua exposição a organismos transgênicos. Uma vez que o fenótipo letal não tem sido observado para diversos estudos de RNAi mediado por plantas transgênicas, sugere-se que sejam exploradas outras repostas dos insetos expostos aos dsRNA, além da mortalidade. Diferenças entre as eficiências de RNAi foram observadas para as diversas espécies de insetos. Entretanto, a persistência nos estudos com RNAi no controle de pragas já permitiu reduzir as incertezas desta abordagem através de melhorias na

especificidade que vieram de uma melhor compreensão das barreiras físicas, captação e entrega do dsRNA.

Apesar dos avanços, o sucesso desta técnica no manejo de pragas na agricultura ainda exige uma investigação quanto ao RNAi sistêmico em insetos, pois, até o momento não há consenso sobre qual mecanismo está envolvido na amplificação do sinal silenciador. A compreensão holística das propriedades sistêmicas do dsRNA, de fisiologia e bioquímica dos insetos, juntamente com melhorias quanto aos métodos de entrega poderão fornecer aplicações inovadoras para o gerenciamento de insetos pragas com um único modo de ação.

Plantas transgênicas que expressam dsRNA pode ser uma alternativa potente para suprimir as pragas de insetos seletivamente, entretanto a atuação desta tecnologia no campo é muito recente e sua viabilidade depende de esclarecimentos quanto ao destino do dsRNA no ambiente, efeitos sobre organismos não-alvo, e principalmente, quanto à possibilidade de desenvolvimento de resistência dos insetos aos cultivos transgênicos.

Plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ expressando ds-RNA do gene *DcV-ATPase-A* mostraram que são capazes de alterar a biologia de *D. citri*, reduzido a duração, sobrevivência e a longevidade de insetos que nelas se desenvolveram. Além disso, foi comprovado que a maquinaria de silenciamento gênico das plantas transgênicas está atuando sobre os psilídeos, assim como o dsRNA/siRNA adquirido através da alimentação está chegando até a célula alvo e provocando a redução da expressão do gene de interesse.

Portanto, a utilização da tecnologia de RNAi é uma ferramenta eficaz em estudos de genômica funcional e sua aplicação no manejo de pragas está próxima de uma realidade. Entretanto, a obtenção de benefícios a longo prazo do RNAi no controle de pragas requerem estratégias adequadas de gerenciamento visando minimizar as pressões seletivas e retardar o desenvolvimento da resistência. Avaliações adequadas dos riscos ambientais estão sendo debatidas pelas agências reguladoras, buscando um equilíbrio entre os benefícios e os riscos potenciais. Os esforços que estão sendo realizados para viabilizar a tecnologia RNAi a colocará em uma posição importante no futuro para o manejo de pragas na agricultura.