



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA**

JONATHA DOS SANTOS SILVA

**Comportamento de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) em
mudas de citros tratadas com moléculas de dsRNA homologas e
não-homologas**

CRUZ DAS ALMAS – BA

FEVEREIRO - 2019

Comportamento de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) em mudas de citros tratadas com moléculas de dsRNA homologas e não-homologas

JONATHA DOS SANTOS SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Colegiado de Graduação de Bacharelado em Biologia do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Gonçalves Lhano – UFRB

Co-Orientador: Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade – EMBRAPA

CRUZ DAS ALMAS – BA

FEVEREIRO – 2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**

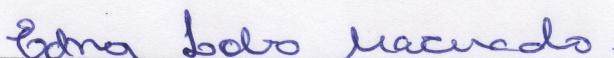
JONATHA DOS SANTOS SILVA

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO
DE CURSO**

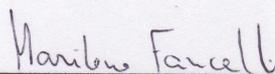
Monografia aprovada em 13/02/2019



Prof. Dr. Marcos Gonçalves Lhano UFRB – CCAAB
(Orientador)



Prof. Dr. Edna Lobo Machado UFRB – CCAAB
(Membro)



Prof. Dr. Marilene Fancelli – EMBRAPA
(Membro)

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Colegiado de Graduação de Bacharelado em Biologia do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biologia.

CRUZ DAS ALMAS - BA

FEVEREIRO – 2019

AGRADECIMENTOS

Concluir uma graduação pode ser interessante de muitas formas, mas Bacharelado em Biologia, para mim, é algo especial... Quando criança, sempre me vi como biólogo, e apesar das divergências do olhar de uma criança para a realidade que enfrentei, sou grato pelo caminho que trilhei. Aproveito a oportunidade para agradecer a todos que fizeram parte disso e que me ajudaram e incentivaram de alguma forma.

Sou especialmente grato a minha mãe, Maria Cecília, por todo amor e apoio que me deu a vida inteira, me criando da melhor forma que pode, fazendo o possível para me proporcionar uma ótima educação. Meu irmão mais novo, Thompson, parceiro de “crime”.

Sou grato à meu co-orientador, Eduardo Chumbinho, pelas oportunidades que me foram dadas, bem como pela paciência e orientação, sendo um exemplo de profissional.

Quero agradecer aos meus companheiros do Laboratório de Virologia e Entomologia, pela ajuda nos trabalhos do dia-a-dia, pela companhia e amizade. Em especial Paulo Meissner e Marilene Fancelli, que me acolheram e me orientaram nos meus primeiros trabalhos acadêmicos.

Às amigades que pude construir no curso, em especial Adriele e Amanda, que mesmo não estando sempre junto, estão sempre presentes. Agradeço pelos momentos compartilhados, as risadas, os “choros”, pelos bons momentos nas aulas e fora também.

Por fim, mas não menos importante, aos meus amigos mais próximos e de longas datas, Eduardo, Breno e Felipe, pelos grandes momentos que compartilhamos, por todo o apoio e afeto proporcionado, vocês tem grande importância na minha vida.

Enfim, agradeço, de coração, a todos que me ajudaram a ser alguém melhor.

EPÍGRAFE

“Before the truth will set you free
It'll piss you off
Before you find a place to be
You're gonna lose the plot”
- Bring Me The Horizon

SUMÁRIO

Lista de Figuras	VII
Lista de Tabelas	IX
Lista de Abreviaturas e Símbolos	X
Resumo	XII
Abstract.....	XIII
Introdução.....	14
Revisão de Literatura.....	16
Citricultura no Brasil	16
Huanglongbing (HLB).....	17
<i>Diaphorina citri</i>	21
RNAi.....	24
Material e Métodos.....	27
Local de execução dos trabalhos	27
Material vegetal e colônia de <i>D. citri</i>	27
Extração de RNA, e reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	27
Síntese das moléculas de dsRNA.....	28
Montagem do bioensaio de livre escolha.....	29
Montagem do bioensaio de Ingestão do dsRNA.....	31
Resultados.....	32
Ingestão do dsRNA pelo psílídeo através das brotações	32
Comportamento do psílídeo em testes de livre escolha.....	33
Discussão.....	37
Conclusões.....	39
Referências	40
Anexo I.....	50

Lista de Figuras

Figura 1. Sintomas do HLB em citros. (A) Planta infectada com HLB. Ramos apresentando folhas amareladas que se destacam devido ao contraste com os ramos não afetados da copa (circulado em vermelho). (B) Folhas com mosqueamento assimétrico nos lados opostos do limbo foliar (delimitado pela nervura central), e frutos pequenos. (C) Frutos malformados e assimétricos, apresentando a columela deslocada (linhas vermelhas). Sementes abortadas e de coloração escurecida (circulo menor). Fotos: Juliana Freitas-Astúa..... 19

Figura 2. Fases de desenvolvimento de *Diaphorina citri*. (A) Ovos de *D. citri*. (B) Ninfas de *D. citri* em estádios de ninfa, do primeiro ao quinto instar (da esquerda para direita). (C) Adulto de *D. citri* recém emergido, apresentando coloração esbranquiçada. (D) Adulto de *D. citri* apresentando coloração padrão. Fotos: David Hall (A e B); Thalita de Freitas Albuquerque (C); Douglas L. Caldwell (D). 24

Figura 3. (A) Brotações de citros após lavagem e exangue em água destilada. (B) Brotação de citros mantidas em microtubos contendo solução de dsRNA. 30

Figura 4. Esquema da instalação do bioensaio de livre escolha mostrando o momento da liberação dos adultos de *D. citri* em bioensaio de livre escolha. 31

Figura 5. Adultos do psíldeo em brotações tratadas com o dsRNA-GFP para período de acesso de alimentação por 48 horas. 32

Figura 6. Detecção de dsRNA no tecido da folha e inseto. (A) Amplificon's testando positivo para presença do dsRNA-Wd-L em tecidos foliar após 24 horas de tratamento. NT, não tratada. Mix - (Reação RT-PCR controle). (B) Amplificon testando positivo para a presença do dsRNA-GFP nos tecidos de insetos que se alimentaram nas brotações tratadas. NT, não tratada. 32

Figura 7. Número médio diário de insetos por tratamento em um período de dez dias. (A) Fc para tratamento (Fc) = 1,32, $p > 0,25$. (B) Fc = 1,47, $p > 0,23$. Não houve diferença estatística no número médio de insetos que se alimentaram em brotações tratadas em comparação às não tratadas, a 5% de probabilidade. 34

Figura 8. Número médio diário de insetos por tratamento em um período de dez dias. (A) Fc para tratamento (Fc) = 0,93, $p > 0,34$. (C) Fc = 0,23, $p > 0,63$. Não houve diferença estatística no número médio de insetos que se alimentaram em brotações tratadas em comparação às não tratadas, à 5% de probabilidade. 35

Figura 9. Número médio diário de insetos por tratamento em um período de dez dias. (A) $F_t = 12,07$, $p < 0,01$. (B) $F_t = 4,40$, $p < 0,04$. Houve diferença significativamente superior no número médio de insetos presentes nas brotações tratadas comparada às não tratadas, à 5% de probabilidade. 36

Lista de Tabelas

Tabela 1. Iniciadores usados para produção e detecção de dsRNAs..... 29

Tabela 2. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fc para tratamento. Gl = Graus de liberdade. CV = coeficiente de variação. 50

Lista de Abreviaturas e Símbolos

% – Porcentagem

µg – Micrograma

µL – Microlitro

AK – Argenina Kinase

Ca. L. – *Candidatus Liberibacter*

CHS – Chalcone sintase

CLaf – *Candidatus Liberibacter africanus*

CLam – *Candidatus Liberibacter americanus*

CLas – *Candidatus Liberibacter asiaticus*

CNPMF – Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura

COV's – Compostos orgânicos voláteis

CVC – Clorose variegada dos citros

D. citri – *Diaphorina citri*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotideo fosfatado

dsRNA – RNA fita dupla

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FUNDECITRUS – Fundo de Defesa da Citricultura

GF – Flavonoide glicosilado

GFP - Proteína fluorescente verde (*Green fluorescent protein*)

HLB – “Huanglongbing”

KCl – Cloreto de potássio

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

miRNA – Micro RNA

Mix - - Reação de RT-PCR controle.

mL – Mililitro

mM – Milimolar

M-MLV – Moloney Murine Leukemia Virus (transcriptase reversa)

mRNA – RNA mensageiro

MSC – Morte súbita dos citros

ng – Nanograma

NT – Não tratado

PIB – Produto interno bruto

RISC – Complexo de silenciamento induzido por RNA

RNA – Ácido ribonucleico

RNAi – RNA interferente

RT-PCR – Transcrição reversa, reação em cadeia da polimerase

siRNA – Pequeno RNA interferente

Taq – *Thermus aquaticus*

Trehal – Trehalose

Tris-HCl – Tris-(hidroximetil)-aminometano ácido clorídrico

U – Unidade

Wd-L – Wing disk-like

Resumo

Com destaque na citricultura mundial, o Brasil é o maior produtor e exportador de suco de laranja, gerando receita anual de US\$ 2 bilhões. Apesar de bem estabelecida, a cultura de citros enfrenta o principal problema fitossanitário que limita a produção; o Huanglongbing (HLB) ou greening dos citros. O HLB é causado por bactérias pertencente ao gênero *Candidatus Liberibacter* (Ca L.). No Brasil, a transmissão do agente causal do HLB é feita por *Diaphorina citri* (Hemíptera: Liviidae). O controle de *D. citri* é baseado no uso de pesticidas, que causam um impacto negativo no meio ambiente. Com isso, há a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias de controle que sejam eficientes e ambientalmente sustentáveis. Estratégias baseada no mecanismo chamado de RNA de interferência (RNAi) estão sendo testadas, e se mostram bastante promissoras. Desde modo, o presente trabalho visa avaliar o comportamento de seleção de hospedeira de *D. citri* em citros tratados com moléculas de RNA fita dupla (dsRNA) homologas e não-homologas ao psilídeo. O trabalho foi realizado na Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), Cruz das Almas – Bahia. Foram utilizadas brotações e ramos juvenis de citros, coletados de mudas mantidas em casa de vegetação. As brotações foram colocadas em microtubos de 1,5 mL contendo água ou solução com a moléculas de dsRNA. Após a absorção da solução com dsRNA, os microtubos com as brotações foram transferidos para suportes. Em gaiolas entomológicas foram acondicionados quatro suportes dispostos de maneira equidistantes, sendo que cada suporte contendo duas brotações tratadas com dsRNA e duas com água. Em seguida, foram liberados até 80 adultos de *D. citri* no centro da gaiola. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com condições ambientais controladas. Diariamente, por um período de 10 dias, foram contabilizados o número de psilídeos por brotação, os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Em quarto, dos seis, bioensaios realizados, não houve diferença significativa entre os números de insetos em brotações tratadas ou não-tratadas; para os demais bioensaios, houve média superior de insetos nas brotações tratadas com dsRNA. Não há evidências que indicam repelência da planta à *D. citri* devido à presença da molécula de dsRNA.

Palavras-chave: HLB, psilídeo, RNA inteferente

Abstract

Brazil is the largest producer and exporter of orange juice, generating annual revenues of US \$ 2 billion. Although well established, citrus cultivation faces the main phytosanitary problem that limits production; Huanglongbing (HLB) or citrus greening. HLB is caused by bacteria belonging to the genus *Candidatus Liberibacter* (Ca L.). In Brazil, transmission of the causative agent of HLB is done by *Diaphorina citri* (Hemiptera; Liviidae). The control of *D. citri* is based on the use of pesticides, which have a negative impact on the environment. Thus, there is a need to develop new control strategies that are efficient and environmentally sustainable. Strategies based on the mechanism called interference RNA (RNAi) are being tested, and are very promising. Thus, the present study aims to evaluate the host selection behavior of *D. citri* in citrus treated with homologous and non-homologous double stranded RNA (dsRNA) molecules to the psyllid. The work was carried out in the Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), Cruz das Almas – Bahia. Citrus flush were collected from plants kept in a greenhouse. The flushes were placed in 1,5 mL microtubes containing water or water solution with the dsRNA molecules. After uptake of the dsRNA, the microtubes with the flushes were transferred to supports. In entomological cages, four supports were arranged equidistantly, each support with two flushes treated with dsRNA and two with water. Then, 80 adults of *D. citri* were released in the center of the cage. The experiment was conducted in a growth chamber under controlled environmental conditions. Daily, for a period of 10 days, the number of psilids in each flush was accounted for. The data were submitted to analysis of variance and the comparison of means was done by the Scott-knott test at 5% probability. In four of the six bioassays performed, there was no significant difference between insect numbers in treated or untreated flushes; for the other bioassays, there was a higher insect mean in the flushes treated with dsRNA. There is no evidence that indicates plant repellency to *D. citri* because of the presence of the dsRNA molecule.

Keywords: HLB, psyllid, RNA Interference

Introdução

O Brasil está entre os maiores produtores de citros, e contribui com cerca de 15% da produção global (FAO, 2017). O país assume a posição de o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja, com uma receita anual aproximada de US\$ 2 bilhões (KIST et al., 2016). A produção nacional de laranja (in natura) em 2017 foi cerca de 17,5 milhões de toneladas (IBGE, 2018). Apesar de bem estabelecida, a cultura de citros vem enfrentando uma série de problemas fitossanitários que limitam a produção, principalmente a proliferação de insetos-praga e patógenos (CHAVEZ et al., 2017).

Um dos principais problemas fitossanitários da cultura é a doença conhecida como Huanglongbing (HLB) ou greening dos citros, considerada a doença mais importante do citros no mundo (BOVÉ, 2006; CHAVEZ et al., 2017). No Brasil, a doença foi identificada em 2004 no estado de São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004), e hoje se encontra disseminada pelos estados do Paraná e Minas Gerais (GOTTWALD, 2010).

O HLB é causado por bactérias Gram negativas pertencentes ao gênero *Candidatus Liberibacter* (Ca. L.), existindo três espécies; *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) e *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) (TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006; CHAVEZ et al., 2017). Estas bactérias são restritas ao floema e promovem alterações anatômicas e fisiológicas, causando o colapso sistema vascular, provocando a sua obstrução e, posteriormente, a necrose, causando a morte das plantas infectadas (BOVÉ, 2006; CHAVEZ et al., 2017).

A transmissão do agente causal do HLB é feita por duas espécies de psíldeos; *Trioza erytreae* Del Guercio (Hemiptera; Psyllidae) e *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera; Liviidae), sendo o segundo, o vetor presente na Ásia e América (TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006; CHAVEZ et al., 2017). O controle de *D. citri* é baseado no uso de pesticidas, que causam um impacto negativo no meio ambiente. Com isso, há a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias de controle que sejam eficientes e ambientalmente sustentáveis.

Entre as estratégias que estão sendo testadas hoje, a mais promissora é baseada no mecanismo chamado de RNA de interferência (RNA interferente, RNAi). O RNAi é um mecanismo natural que ocorre em células eucarióticas, e está envolvido na regulação gênica e defesa antiviral (FIRE et al., 1998). O mecanismo é ativado por moléculas de RNA fita dupla (dsRNA), e atua como um silenciador gênico por meio da degradação de RNAs mensageiros (mRNAs), de maneira sequência-específica (FIRE, 2007). A

degradação dos mRNAs resulta na diminuição da expressão ou supressão total do gene alvo (FIRE et al., 1998).

Em anos recentes, diferentes grupos de pesquisa tem demonstrado a possibilidade de se usar o mecanismo de RNAi para o controle de insetos-praga na agricultura (BAUM et al., 2007; MAO et al., 2007; ANDRADE; HUNTER, 2017). O desenvolvimento de medidas de controle via RNAi torna possível a produção de pesticidas altamente específicos, reduzindo os impactos negativos ao ecossistema e à própria cultura (PRICE; GATEHOUSE, 2008; WHYARD; SINGH; WONG, 2009; WANG et al., 2011). Estratégias utilizando os princípios do RNAi vem sendo estudadas afim de elaborar métodos para o controle de *D. citri* (ANDRADE; HUNTER, 2016; ANDRADE; HUNTER, 2017).

Desde modo, o presente trabalho visou avaliar o comportamento de seleção de hospedeiro por de *D. citri* em citros tratados com moléculas de dsRNA homologas e não-homologas ao psilídeo.

Revisão de Literatura

Citricultura no Brasil

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae, sendo o mais importante gênero na perspectiva econômica. Existem diversas espécies, variedades e cultivares de citros que se destacam como as de maior importância comercial; laranjas doces, tangerinas, limões, limas ou limas ácidas, e pomelos (DONADIO et al., 1998; BASTOS et al., 2014). O Brasil é líder mundial em produção de laranjas, seguido pela China, Índia e Estados Unidos (FAO, 2017). Além das laranjas, as frutas cítricas mais produzidas no país são os limões e tangerinas (KIST et al., 2016)

Segundo Neves et al. (2010, 2012), evidências sugerem que a laranja é originária do Sul do continente asiático (China); a expansão do comércio e guerras promoveram a dispersão dos citros, sendo introduzida na Europa na Idade Média, por ação dos árabes, e na América a partir de 1500, via expedições marítimas. No Brasil, a introdução ocorreu no início da colonização, onde a laranja encontrou excelentes condições de cultivo, demonstrando alta adaptabilidade às condições edafoclimáticas do território nacional, dispersando por todo o país (NEVES et al., 2010).

A região Sudeste do Brasil é o principal polo de produção desde o início da história citrícola no país. O primeiro núcleo produtor surgiu no Rio de Janeiro, em 1920, nos arredores de Nova Iguaçu. Neste cenário, o Brasil já realizava suas primeiras exportações para Argentina, e outros países europeus como a Inglaterra (NEVES, et al., 2010). Vinte anos mais tarde, a citricultura se desenvolveu no estado de São Paulo, onde obteve maior expansão e importância econômica, principalmente devido às condições de solo, clima e relevo, além do escoamento rápido ao mercado consumidor (NEVES et al., 2010, 2012).

A região de maior produção é denominada de Cinturão citrícola, esta área compreende o estado de São Paulo, sudoeste de Minas Gerais e uma parte do Triângulo mineiro (BARROS et al., 2016). A região Nordeste é a terceira maior produtora nacional, com mais de 1,27 milhões de toneladas produzidas, em cerca de 106.000 hectares cultivados, representando aproximadamente 7% da produção do país (IBGE, 2018). Os estados da Bahia e Sergipe correspondem a 86% da produção nordestina (IBGE, 2018). O estado de São Paulo é o maior produtor nacional, e representa 62% da área de produção do país, e em 2017 foi responsável por aproximadamente 77% do volume colhido;

seguido por Minas Gerais, Paraná e Bahia (BARROS et al., 2016; KIST et al., 2016; IBGE, 2018).

Grande parte da produção de laranjas do cinturão é destinada ao processamento industrial, e o país exporta até 98% dos processados citrícolas; das 1.178 extratoras de suco do país, 1.061 estão no estado de São Paulo (NEVES, et al., 2010; BARROS et al., 2016). O Brasil dispõe de 50% da produção mundial de suco de laranja, tendo uma participação de até 85% no mercado internacional; a cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são brasileiros (NEVES, et al., 2010; BARROS et al., 2016). Em 2009, o PIB do setor citrícola alcançou aproximadamente US\$ 6,5 bilhões, sendo US\$ 2,15 e 4,39 bilhões nos mercados externo e interno respectivamente (NEVES, et al., 2010).

A citricultura brasileira se destaca internacionalmente pela organização e competitividade, e tem importante impacto socioeconômico no país, tanto pela movimentação de mercado como pelos mais de 250 mil empregos diretos gerados (KIST et al., 2016). Apenas no estado da Bahia, são até 20 mil citricultores e mais 100 mil pessoas envolvidas indiretamente no segmento, gerando receitas superiores a R\$ 350 milhões (NEVES, et al., 2010; KIST et al., 2016).

Entre os principais desafios da citricultura brasileira e mundial, os problemas fitossanitários são os que mais reduzem a produtividade e causam o aumento do custo de produção. Entre os anos de 2000 a 2010, foram erradicados aproximadamente 40 milhões de árvores devido incidência de pragas e doenças, contabilizando perdas de até 80 milhões de caixas/ano (NEVES, et al., 2010). As doenças de maior importância para citricultura são; a clorose variegada do citros (CVC), o cancro cítrico, a morte súbita (MSC), e o Huanglongbing (HLB) ou greening dos citros, considerada a doença mais severa e importante na citricultura mundial (BOVÉ, 2006; NEVES, et al., 2010; KIST et al., 2016).

Huanglongbing (HLB)

O Huanglongbing (HLB) ou greening dos citros foi reportada pela primeira vez no ano de 1870, em Taiwan, onde recebeu o nome de “Huanglongbing” (HLB), que significa “Doença do Dragão Amarelo”. Em seguida, casos similares da doença foram observados no Sul da China (1919), onde ficou conhecida como “yellow shoot” (ramo amarelo), Filipinas (1921), África do Sul (1928), Índia, Indonésia e Tailândia (1960s) (BOVÉ, 2006).

O HLB é considerado por muitos autores a mais severa doença da citricultura mundial devido às dificuldades de controle e severidade de seus sintomas; rápida disseminação, elevadas perdas de produção e qualidade dos frutos, e, até o momento, não se conhece nenhuma variedade comercial ou porta-enxerto resistente (BOVÉ, 2006; FUNDECITRUS, 2009; RAITHORE et al., 2015). Os sintomas podem ser observados durante todo ano, mas com maior frequência no início da primavera até o final do verão (FUNDECITRUS, 2009).

A doença foi reportada na América apenas em 2004, no estado de São Paulo (Brasil). Atualmente, além do estado de São Paulo, a doença pode ser encontrada em Minas Gerais e Paraná. Levantamento feito nas regiões citrícolas de SP e MG revelou que aproximadamente 17% das plantas (cerca de 32 milhões) apresentam sintomas do HLB (FUNDECITRUS, 2017c). Desde o aparecimento do HLB no Brasil, o país tem feito a erradicação das plantas infectadas com o HLB, ação que é inquerida pela Instrução Normativa Federal n.53 de 16/10/2008. Além disso, também é feito o controle rígido do inseto vetor nas regiões afetadas pela doença, o que vem garantindo a uma baixa taxa de disseminação nas áreas afetadas pela doença (FUNDECITRUS, 2017c). O controle do HLB resultou em um aumento de 85% nos custos de produção, quando comparadas as safras de 2004/05 à de 2015/16 (FUNDECITRUS, 2017b).

Em 2005, a doença foi registrada na Flórida, Estados Unidos. Nos últimos anos vem ocorrendo uma grande redução da produção no estado, chegando a aproximadamente 60%. Estima-se que até 90% das plantas do estado estejam infectadas com o HLB (HALBERT et al., 2012; FUNDECITRUS, 2017a).

Os sintomas nas plantas infectadas podem ser caracterizados pelo surgimento de ramos apresentando manchas irregulares em tons de amarelo que se destacam devido ao contraste com os ramos não afetados da copa, folhas com mosqueamento ou clorose assimétrica em relação aos lados opostos do limbo foliar (delimitado pela nervura central) (Figura 1A). Estes sintomas podem ser confundidos com deficiências nutricionais de zinco, manganês, magnésio e cobre ou mesmo outras doenças como a Clorose Variegada dos Citros (CVC) e Gomose (BOVÉ, 2006; FUNDECITRUS, 2009). Os ramos afetados podem apresentar folhas de tamanho reduzido e curvadas, além nervuras grossas e escurecidas, há também um alto índice de desfolha, e, nos casos mais graves, a morte dos ponteiros (BELASQUE JR. et al., 2009).

Os frutos gerados são pequenos, malformados e assimétricos (Figura 1C), muitas vezes se desprendem da planta precocemente (BOVÉ, 2006; FUNDECITRUS, 2009).

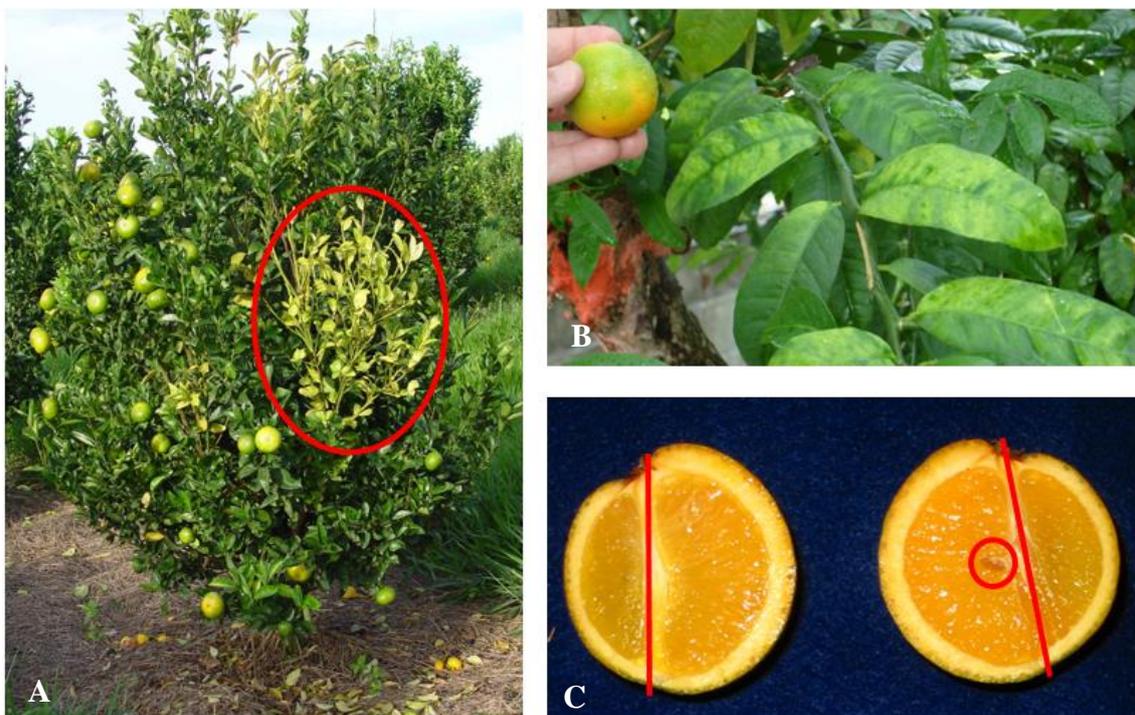


Figura 1. Sintomas do HLB em citros. (A) Planta infectada com HLB. Ramos apresentando folhas amareladas que se destacam devido ao contraste com os ramos não afetados da copa (circulado em vermelho). (B) Folhas com mosqueamento assimétrico nos lados opostos do limbo foliar (delimitado pela nervura central), e frutos pequenos. (C) Frutos malformados e assimétricos, apresentando a columela deslocada (linhas vermelhas). Sementes abortadas e de coloração escurecida (círculo menor). Fotos: Juliana Freitas-Astúa.

Além disso, as características organolépticas dos frutos são alterados, apresentando um alto teor de acidez (BASSANEZI; MONTESIMO; STUCHI, 2009). As sementes dos frutos são abortadas, de tamanho pequeno e coloração escurecida (FUNDECITRUS, 2009).

Há também o comprometimento do sistema radicular, que apresenta baixo desenvolvimento; conseqüentemente, é possível observar plantas de tamanho reduzido, atrofiadas e raquíticas (DA GRAÇA, 1991; AUBERT, 1992; FUNDECITRUS, 2009).

O período de incubação é longo, e a observação dos sintomas da doença em plantas infectadas com HLB pode variar de seis meses a dois anos. Plantas assintomáticas servem como fonte de inóculo para subseqüentes infecções, dificultando o controle e manejo da doença em campo (SPANN et al. 2010).

O HLB é causado por bactérias gram negativas pertencentes ao filo das proteobactérias, subdivisão α (Alphaproteobactéria), ordem Rhizobiales, família Rhizobiaceae (GARNIER; DANIEL; BOVÉ, 1984). Pertencem ao gênero *Candidatus Liberibacter* (Ca. L.), existindo três espécies: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) e *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) (TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006; CHAVEZ et al., 2017). Devido às dificuldades de cultivo *in vitro* dessas bactérias, sua classificação taxonômica não é definitiva, e o status de *Candidatus* é utilizado como prefixo de denominação temporária (MURRAY; SCHLEIFER, 1994). A classificação da bactéria foi estabelecida por microscopia eletrônica e comparação de sequências do DNA ribossomal, região 16S (GARNIER; DANIEL; BOVÉ, 1984; JAGOUÉIX; BOVE; GARNIER, 1994; SECHLER et al., 2009).

Das três bactérias, CLas é a mais disseminada, sendo encontrada em países dos continentes Asiático e Americano, enquanto que CLam encontra-se restrita ao Brasil e China e CLaf ao continente africano e algumas regiões do Oriente Médio (TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006; HALL et al., 2012)

Na planta, estas bactérias são restritas ao floema e promovem alterações anatômicas, morfologias e fisiológicas devido à colonização dos tubos do floema, promovendo o acúmulo de amido no sistema vascular (BOVÉ, 2006; ETXEBERRIA et al., 2009; CHAVEZ et al., 2017). A obstrução do floema impede o fluxo e distribuição dos fotoassimilados sintetizados na copa, dificultando a translocação de macro e micronutrientes, causando a morte das plantas infectadas (BOVÉ, 2006; ETXEBERRIA et al., 2009; CHAVEZ et al., 2017).

A transmissão do agente causal do HLB pode ocorrer por meio da enxertia de material propagativo infectado (COLETTA-FILHO et al., 2010). Em campo, a transmissão é feita por duas espécies de psílídeos; *Trioza erytrae* (Del Guercio) (Hemíptera; Psyllidae) e *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemíptera; Liviidae), sendo o segundo, o principal vetor na Ásia e América (TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006; CHAVEZ et al., 2017).

A interação vetor-patógeno é persistente; após a bactéria ser adquirida, pode ser detectada e transmitida durante toda a vida do inseto (HUNG et al., 2004; PELZ-STELINSKI et al., 2010). São necessários apenas 30 minutos de alimentação em uma planta infectada para o psílídeo adquirir a bactéria, e entre 15 a 30 minutos para transmitir o patógeno para uma planta sadia, com maior eficiência de transmissão em períodos mais

extensos de alimentação (ROISTACHER, 1991; MEAD; FASULO, 2011; ROGERS; STANSLY, 2012).

Até o momento, não há medidas adequadas ao manejo do HLB no tocante ao controle da bactéria. O tratamento de plantas infectadas por meio de antibióticos tem se mostrado ineficaz, além de um potencial risco ambiental, sendo então, necessário a erradicação das plantas infectadas. A prevenção da infecção é a melhor forma de controle da doença, neste sentido, a supressão do inseto vetor é de grande importância (BOVÉ, 2006; LOPES et al., 2007).

Diaphorina citri

O psílídeo dos citros, *Diaphorina citri*, é originário do sul asiático, sendo descrito pela primeira vez em citros na cidade de Shinchiku, Taiwan, em 1907 (HALBERT; MANJUNATH, 2004). O psílídeo *D. citri* teve seu primeiro registro no Brasil em 1942 (HALBERT; MANJUNATH, 2004; COLETTA-FILHO et al., 2004; BOVÉ, 2006). O psílídeo possui uma ampla distribuição, estando presente no Sul da Ásia, Arábia Saudita, América do Sul, Central e Sul dos Estados Unidos, por esta razão e por ser vetor do HLB, *D. citri* é considerado atualmente o mais importante inseto-praga da citricultura mundial (HOLLIS, 1987; HALBERT; MANJUNATH, 2004; TEIXEIRA et al., 2005; PORTALANZA et al., 2017).

D. citri possui um ciclo de vida curto, variando entre 15 e 47 dias (ovo-adulto), dependendo da temperatura (LIU; TSAI, 2000). São encontrados preferencialmente nas brotações mais jovens, onde as fêmeas fazem a postura dos ovos (CHAVAN; SUMMANWAR, 1993). Os ovos possuem cor amarelada, e tamanho médio de 0,31 mm de comprimento e 0,14 mm de largura (Figura 2A), e eclodem em 2 – 4 dias após a postura (LIU; TSAI, 2000). As ninfas passam por cinco estádios intermediários (instares) (Figura 2B), que se completam entre 11 a 15 dias. O inseto adulto, ao emergir, apresenta coloração esbranquiçada (Figura 2C), tornando-se mais escuro à medida que envelhece (Figura 2D) (CHAVAN; SUMMANWAR, 1993). O inseto adulto possui uma expectativa de vida de até 90 dias, e neste período uma fêmea pode vir a colocar até 800 ovos (LIU; TSAI, 2000; PARRA et al., 2010).

Estes insetos apresentam variação na coloração do abdômen, podendo apresentar-se cinza, azul esverdeado e amarelo alaranjado (WENNINGER; HALL, 2007). Fêmeas

com o abdômen em tons de amarelo alaranjado possivelmente estão acasaladas (BLACKWEL, 2005; HALL, 2008; WENNINGER; HALL, 2008).

O psílídeo dos citros possui hábito diurno, e sua atividade em campo é restrita às horas de luz do dia (WENNINGER; HALL, 2007). A escolha da planta hospedeira pode ser influenciada por diversos fatores como o estágio de maturação do tecido foliar, sinais visuais, químicos, olfatórios e gustativos (PATT et al. 2011; AMMAR; HALL; SHATTERS-JR, 2013; RUAN et al., 2015; HALL; HENTZ; PATT, 2015; EBERT et al., 2018). Os aspectos fitossanitários da planta hospedeira também são relevantes no processo de escolha. Plantas de citros infectadas com o HLB são mais atrativas à *D. citri*, pois durante alimentação, os insetos promovem a liberação de salicilato de metila, composto químico atrativo ao psílídeo (MANN et al., 2012).

Diaphorina citri pode ocasionar danos diretos em uma planta hospedeira apenas quando presente em elevados níveis populacionais. Estes danos, que são característicos de insetos sugadores, resultam na má formação das brotações, tornando-as retorcidas, com as folhas curvadas ou enroladas (HALBERT; MANJUNATH, 2004; MICHAUD, 2004). Nos casos mais graves, a alta infestação do inseto promove a morte do ramo em desenvolvimento (MICHAUD, 2004). Além disso, as ninfas de *D. citri* excretam continuamente uma substância rica em carboidratos (*honeydew*), que acumulam sobre as folhas e frutos, favorecendo o desenvolvimento de fungos causadores da fumagina (*Capnodium* spp.), dificultando a transpiração e respiração, bem como os processos fotossintéticos, além da depreciação do valor comercial dos frutos (TSAI; LIU, 2000).

O psílídeo dos citros consegue se desenvolver em uma faixa de temperatura que varia entre 15 a 30 °C, contudo o intervalo ótimo de desenvolvimento é entre 25 a 28 °C (LIU; TSAI, 2000). *Diaphorina citri* não consegue completar seu ciclo de vida em temperaturas inferiores a 10 °C ou superiores a 33 °C (LIU; TSAI, 2000). O inseto pode ser encontrado durante todo o ano, entretanto, os picos populacionais ocorrem entre a primavera e verão; em contrapartida, nas estações chuvosas, a população do inseto pode ser suprimida (YAMAMOTO; PAIVA; GRAVENA, 2001; TSAI; WANG; LIU, 2002).

A flutuação da população do *D. citri* em campo está relacionada ao fluxo vegetativo do pomar, à disponibilidade de brotações, à faixa de temperatura ideal para seu desenvolvimento e às taxas pluviométricas (LIU; TSAI, 2000; YAMAMOTO; PAIVA; GRAVENA, 2001). Neste sentido, o monitoramento populacional do inseto é de grande importância para manejo do HLB, e deve ser feito por todos os citricultores de uma dada região. O fluxo de psílídeos pode ocorrer entre pomares sem manejo e pomares

sob ações de controle, mesmo com uso de pesticidas, e este fluxo favorece a formação de novas áreas com infecções primárias (BOINA et al., 2009; FUNDECITRUS 2017a).

O controle de *D. citri* é feito principalmente através do uso de inseticidas, e os citricultores dispõem de uma grande variedade destes, sejam de ação de contato ou sistêmico (YAMAMOTO et al., 2009). Entretanto, a baixa seletividade destes agroquímicos promove o aumento do custo ambiental, uma vez que pode eliminar a fauna benéfica ou favorecer o surgimento de populações de insetos-praga resistentes, além de outros possíveis efeitos colaterais ao meio ambiente (YAMAMOTO et al., 2009; RUIZ-GALVÁN et al., 2015).

Novos métodos vem sendo estudados para o controle de insetos-praga que tenham menor impacto ambiental. Entre os métodos, a tecnologia do RNAi tem se mostrado eficiente, abrindo a possibilidade do desenvolvimento de estratégias de manejo para insetos praga via produção de pesticidas altamente específicos e com reduzidos efeitos colaterais em organismos não alvo e meio ambiente (BAUM et al. 2007; MAO et al. 2007; ANDRADE; HUNTER, 2017; PRICE; GATEHOUSE, 2008; WHYARD; SINGH; WONG, 2009; WANG et al., 2011).

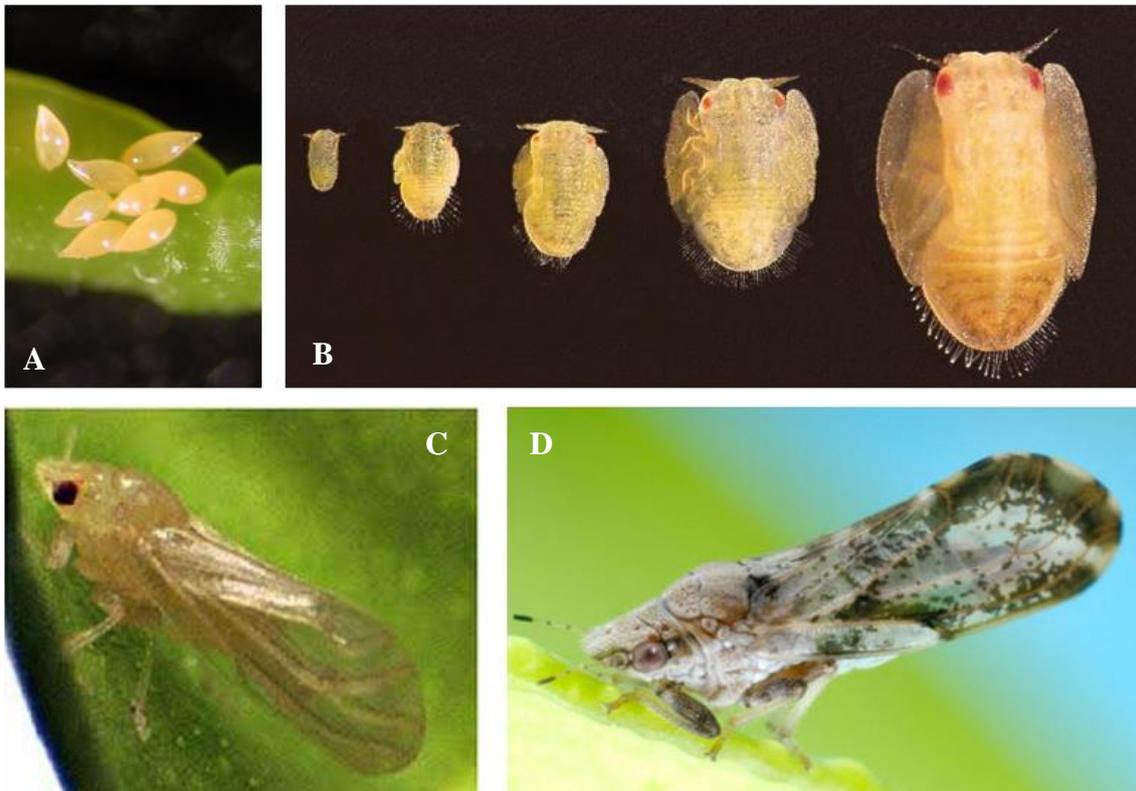


Figura 2. Fases de desenvolvimento de *Diaphorina citri*. (A) Ovos de *D. citri*. (B) Ninfas de *D. citri* em estádios de ninfa, do primeiro ao quinto instar (da esquerda para direita). (C) Adulto de *D. citri* recém emergido, apresentando coloração esbranquiçada. (D) Adulto de *D. citri* apresentando coloração padrão. Fotos: David Hall (A e B); Thalita de Freitas Albuquerque (C); Douglas L. Caldwell (D).

RNAi

O silenciamento de genes por RNA de interferência (RNA interferente, RNAi) é um processo natural que ocorre nas células eucarióticas, e está envolvido na atividade de regulação gênica e defesa antiviral celular (FIRE et al., 1998). O fenômeno de silenciamento gênico foi observado pela primeira vez em 1990 por pesquisadores que buscavam alterar geneticamente a coloração de flores do gênero *Petunia*, inserindo uma cópia extra do gene chalcone sintase (CHS), responsável pela biossíntese de antocianinas (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990).

Contudo, o que se obteve foram flores com diferentes padrões de variegação ou mesmo com nenhuma pigmentação (brancas). Foi constatado que a despigmentação estava relacionada à diminuição do níveis do mRNA do CHS, tanto do gene endógeno quanto da cópia introduzida, o fenômeno foi denominado como co-supressão (NAPOLI;

LEMIEUX; JORGENSEN, 1990; VAN DER KROL et al., 1990). Este mesmo fenômeno foi observado após introdução de sequências de RNA fita simples, *antisense* (complementar ao mRNA) no nematoide *Caenorhabditis elegans* (GOU; KEMPHUES, 1995). Em 1998 foi constatado que o mecanismo podia ser ativado de forma mais eficiente por moléculas de RNA fita dupla (dsRNA) (FIRE et al., 1998).

O silenciamento gênico ocorre pelo impedimento da tradução ou pela degradação de RNAs mensageiros (mRNAs), resultando na diminuição da expressão ou supressão total do gene alvo (FIRE et al., 1998). O processo básico do RNAi pode ser dividido em três etapas principais (TOMARI; ZAMORE, 2005). Primeiro, o mecanismo é ativado pela presença de uma molécula de RNA fita dupla (dsRNA) (denominada de molécula gatilho), que pode ser expressa ou introduzida na célula. Este RNA é então cortado em pequenos RNAs de fita dupla (21-25nt), chamados de small interfering RNA (siRNA), por uma ribonuclease III, chamada Dicer. Na segunda etapa do mecanismo de RNAi, uma das fitas do siRNA é removida e a fita que permanece (chamada de fita guia) é incorporada a um complexo proteico conhecido como o complexo de silenciamento induzido por RNA (RNA Induced Silencing Complex, RISC). Na última etapa, o complexo RISC atua para identificar e degradar mRNAs que compartilhem homologia com o siRNA. Em teoria, qualquer mRNA de uma célula pode ser degradado de forma específica via RNAi. Outra característica do mecanismo de RNAi é seu caráter sistêmico, ou seja, após ser ativado em uma célula, um sinal é “transmitido” para as outras células (FIRE et al., 1998). Este sinal sistêmico é um siRNA, pois além de ser pequeno, assim de fácil movimento, é a molécula que confere a especificidade ao mecanismo (MLOTSHWA et al., 2002).

Os dsRNAs podem ser classificados em duas categorias de acordo com sua função e origem; micro RNAs (miRNAs) e pequenos RNAs interferentes (siRNA – *short interfering RNA*) (MEISTER; TUSCHL, 2004; YI et al., 2003).

Os miRNA são dsRNAs endógenos de sequências curtas, apresentando cerca de 22 nucleotídeos, inicialmente transcritos como um RNA primário longo, que ainda no núcleo sofre processamento via complexo enzimático mediado por uma RNase III (Drosha), tornando-se um pré-miRNA, de aproximadamente 70pb que apresenta trecho de dupla fita e uma alça de fita simples. Este pré-miRNA é exportado para o citoplasma, onde é processado pela Dicer, formando um miRNA maduro, com cerca de 22 nucleotídeos. O miRNA é acoplado ao complexo RISC que promove o pareamento do miRNA ao mRNA-alvo, promovendo o silenciamento gênico (RIVAS et al., 2005).

A Dicer é uma enzima essencial no mecanismo de RNAi, sendo responsável pelo tamanho do dsRNA formado (RIVAS et al., 2005). As proteínas Argonautas podem se ligar à miRNAs e siRNAs, apresentando atividade endonuclease contra mRNAs complementares a estes RNAi's; além disso, tem função de selecionar a fita do siRNA para junção ao RISC (RAND et al., 2005; HÖCK; MEISTER, 2008).

Os siRNAs são originados do processamento de moléculas de dsRNAs exógenas (vírus, transposons e sintéticos), que ao entrarem na célula, são processados pela Dicer com tamanhos entre 19 a 30 pares de bases. Os siRNAs podem ser sintetizados *in vitro*, e introduzidos diretamente na célula alvo (CARMELL et al., 2002; MORRIS et al., 2004; RAND et al., 2005).

O mecanismo de RNAi é relativamente conservado entre os eucariotos. Desta forma, as tecnologias de RNAi podem ser utilizadas em qualquer espécie de inseto (FIRE, 2007; WHYARD; SINGH; WONG, 2009). A especificidade da sequência do dsRNA permite a possibilidade do silenciamento de genes que sejam críticos e essenciais à sobrevivência de uma única espécie de inseto, permitindo a criação de pesticidas altamente específicos e que não afetem negativamente a fauna benéfica (WHYARD; SINGH; WONG, 2009).

Um dos pontos chaves para o desenvolvimento de métodos de controle baseado na tecnologia do RNAi é a identificação de genes alvos que sejam essenciais à sobrevivência do inseto, favorecendo uma alta taxa de mortalidade (ROBINSON et al., 2011; WANG et al., 2011). Outro ponto importante é o desenvolvimento de métodos de produção e aplicação de um produto contendo a molécula de dsRNA (ANDRADE; HUNTER, 2017). Até o momento, existe uma variedade de milho transgênico baseada na tecnologia do RNAi para resistência à broca-do-milho, *Diabrotica virgifera* (HEAD et al., 2017).

O desenvolvimento de estratégias de aplicação do RNAi nas culturas em campo é um importante passo para o uso efetivo desta tecnologia. Para isso, deve-se levar em consideração a biologia do inseto, bem como seus hábitos alimentares (ANDRADE; HUNTER, 2017). *Diaphorina citri* é um inseto sugador, assim o dsRNA precisa estar presente no sistema vascular para ser ingerido pelo inseto. É importante avaliar o comportamento de seleção de hospedeira do inseto alvo frente à presença do dsRNA na planta hospedeira. Um produto à base de dsRNA para controle de insetos não deve apresentar ação repelente, pois o inseto pode evitar alimentar-se nesta planta.

Material e Métodos

Local de execução dos trabalhos

O trabalho foi realizado na Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), Cruz das Almas – Bahia, no Laboratório de Virologia e em Câmara de Crescimento com ambientação controlada (temperatura e fotoperíodo).

Material vegetal e colônia de *D. citri*

Para realização dos trabalhos, foram utilizadas brotações e ramos juvenis de laranja doce (cv. Valência) [*Citrus sinensis* (L.)], coletados em mudas mantidas em casa de vegetação. Adultos de *D. citri* foram obtidos da colônia estabelecida no insetário, sob condições de temperatura controlada.

Extração de RNA, e reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Para a extração de RNA total do psilídeo, foram coletados grupos de 3 adultos usando aspirador bucal entomológico, que foram transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo micro esferas de vidro e 50 µL de água livre de nucleases. Com o auxílio de um pistilo, os insetos foram macerados até formar uma solução homogênea. Em seguida, foram adicionados 1 mL de Trizol® (Thermo-Fisher Scientific) e o RNA total do inseto foi extraído seguindo o protocolo do fabricante. Para a extração de RNA total de citros, amostras foliares de brotações tratadas com dsRNA foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido, e maceradas com auxílio de pistilo e cadinho. O RNA total da planta foi extraído utilizando o método do TRIzol® (Thermo-Fisher Scientific).

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase utilizando Kit comercial Turbo DNA-free™ (Thermo-Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Após esse procedimento, o cDNA foi sintetizado utilizando o kit comercial First Strand cDNA Synthesis (Thermo-Fisher Scientific). Em um microtubo de 200 µL foram adicionados 2 µg do RNA, 50 ng de iniciadores hexâmeros aleatórios, e 1 µL de dNTP's a 10 mM, em seguida foram incubados por 2 min a 70 °C (ou 95 °C para o teste de detecção do dsRNA). Terminado esse tempo, as amostras foram imediatamente transferidas para o gelo por 2 min. Em seguida, foram adicionados 4 µL de tampão 5x (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 20 U de RNase

Out (Thermo-Fisher Scientific) e 20 U de M-MLV (Thermo-Fisher Scientific). Após homogeneização, as amostras foram incubadas a 25 °C por 10 min, 37 °C por 50 min, 95 °C por 3 min, e as reações mantidas em 8 °C até a retirada das amostras do aparelho.

Para reação de PCR, foi utilizado o kit comercial Invitrogen™, Taq DNA Polymerase; em microtubos de 200 µL foram adicionados 1 µL do cDNA, 10 mM de cada primer específico, 3 µL de tampão 10x (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 0,9 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,6 µL de dNTP's a 10 mM, 0,3 µL de Taq DNA Polymerase (5 U/µL), e 17,2 µL de água livre de nucleases, totalizando 25 µL de reação por amostra. As reações de PCR utilizaram as seguintes condições de amplificação: 94 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos à 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 50 s, uma etapa à 72 °C por 5 min, e as reações mantidas à 8 °C até a retirada das amostras do aparelho.

Síntese das moléculas de dsRNA

As moléculas de dsRNA para realização dos ensaios foram sintetizados utilizando o kit comercial Mega-script RNAi (Thermo-Fisher Scientific), seguindo o protocolo do fabricante.

Para a síntese dos dsRNAs, a primeira etapa foi o desenho de pares de oligonucleotídeos para amplificação por PCR de um fragmento de DNA dos genes alvos (Tabela 1). Nas extremidades 5' de cada oligonucleotídeo foi incluída a sequência do promotor reconhecido pela T7 RNA polimerase, enzima utilizada no kit para a síntese de dsRNAs. O fragmento correspondente a região dos genes alvos foram amplificados por RT-PCR, utilizando o RNA total extraído de *D. citri*. Após a amplificação, os produtos de RT-PCR foram purificados e utilizados como molde para a síntese do dsRNA (utilizando o MEGA-script RNA Kit®). Foram realizadas a síntese de dsRNA's correspondentes a uma região dos genes para Argenina Kinase (dsRNA-Ak), Wing disk-like (dsRNA-Wd-L) e Trehalase (dsRNA-Trehal) do psilídeo. Como controle, foram utilizados dsRNAs que não apresentam homologia com nenhum gene do psilídeo, a proteína fluorescente verde (*Green fluorescent protein*, GFP - dsRNA-GFP) e do gene rhamnosyltransferase de *Cucurbita maxima* (dsRNA-GF). Estes dsRNAs foram sintetizados em empresa especializada (AgroRNA).

Tabela 1. Iniciadores usados para produção e detecção de dsRNAs.

Nome	Sequencia ¹
dsAK-F3	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGTGGCATTCTTGTATGGCGTA</u>
dsAK-R2	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGGCCTGCAAGAATCTGTCTCC</u>
dsWd-L-F1	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGATCTGCACTGTTCTTCATTTGC</u>
dsWd-L-R3	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGGAAAATAAAGAAATGCAAGATGG</u>
dsTrehal-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGTCAATGCGATCCTTCAGATG</u>
dsTrehal-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGGGTCTTCCGGACATGAAAGA</u>
GPF-F3	<u>TGGTAAAAGGACAGGGCCAT</u>
GFP-R3	TACAAGACACGTGCTGAGGT

¹A sequência sublinhada corresponde a sequência T7.

Montagem do bioensaio de livre escolha

Para verificar se a presença da molécula de dsRNA na brotação de citros interfere no comportamento de alimentar do psílídeo, foram montados bioensaios de livre escolha. Foram avaliadas cinco diferentes moléculas de dsRNA, sendo três com sequências homólogas a genes do psílídeo e outras duas com sequências não homólogas.

Com o auxílio de uma tesoura de poda, brotações de citros foram cortadas com aproximadamente 15 cm de comprimento. Após a coleta, as brotações foram transportadas para o Laboratório de Virologia e lavadas em solução de hipoclorito de sódio à 5% por 10 minutos para reduzir a contaminação por bactérias, e enxaguada em água destilada (Figura 3A). Utilizando uma lâmina (bisturi), o excesso de folhas foi removido, deixando apenas 3 folhas, e a base do caule foi cortada em um ângulo de 45°, padronizando as brotações em aproximadamente 10 cm de comprimento. As brotações foram transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo 0,5 mL de água, e a abertura do microtubo foi selada com o auxílio de Parafilm® “M”, para evitar a evaporação do conteúdo e a queda dos insetos durante a realização dos bioensaios (Figura 3B).

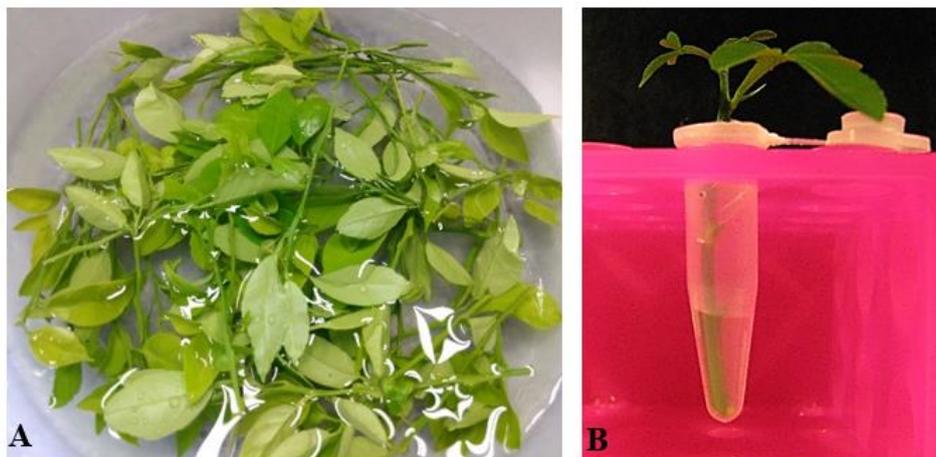


Figura 3. (A) Brotações de citros após lavagem e exangue em água destilada. (B) Brotação de citros mantidas em microtubos contendo solução de dsRNA.

Para certificar que não houve nenhum dano ao sistema vascular das brotações, bem como à sua capacidade de absorção de água, as brotações foram mantidas em ambiente com iluminação natural por 24 horas. Após esse período, o excesso de água foi removido com o auxílio de uma seringa com agulha de 0,46 mm, e 0,5 mL da solução de dsRNA a 1 ng/ μ L foi adicionado ao microtubo.

Após absorção de 90 – 95% da solução de dsRNA, com o auxílio da seringa, o tubo foi preenchido com água. As brotações foram transferidas para suportes, sendo quatro brotações por suporte (2 brotações tratadas com dsRNA e duas brotações tratadas com água). Em cada gaiola, modelo BugDorm-2120® (Bugdorm), foram acondicionados quatro suportes, dispostos de maneira equidistantes, e posteriormente foram liberados entre 50 e 80 adultos de *D. citri* (Figura 4). A gaiola foi mantida em câmara de crescimento com luz artificial (fotoperíodo 12h/12h), temperatura 25 °C e umidade média 70%.

A avaliação comportamental dos insetos foi observada diariamente durante 10 dias. Foi quantificado o número de insetos em cada brotação. Ao final, foi calculado o número médio diário de insetos presentes em cada um dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-knott ($p > 0,05$). Foram realizados seis experimentos, cinco comparando o tratamento com dsRNA versus água (dsRNA-AK x Água, dsRNA-Trehal x Água, dsRNA-Wd-L x Água, dsRNA-GF x Água, dsRNA-GFP x Água) e um experimento controle, com todas as brotações tratadas apenas com água. Para análises do bioensaio

controle, as brotações foram divididas em “tratadas” e “não-tratadas”. Cada experimento foi repetido quatro vezes.



Figura 4. Esquema da instalação do bioensaio de livre escolha mostrando o momento da liberação dos adultos de *D. citri* em bioensaio de livre escolha.

Montagem do bioensaio de Ingestão do dsRNA

Para comprovar a translocação do dsRNA pelas brotações de citros, ramos tratados com o dsRNA-Wd-L foram analisados quanto a presença do dsRNA. Para confirma a ingestão pelos psilídeos do dsRNA presente nas brotações, adultos de *D. citri* foram mantidos por 48h se alimentando em brotação tratada com o dsRNA-GFP (Figura 5).



Figura 5. Adultos do psilídeo em brotações tratadas com o dsRNA-GFP para período de acesso de alimentação por 48 horas.

Resultados

Ingestão do dsRNA pelo psilídeo através das brotações

A amplificação por RT-PCR de um fragmento de aproximadamente 300 pb em folhas após 24 horas do tratamento, confirmou a presença do dsRNA-Wd-L nas folhas da brotação (Figura 6A). A presença do dsRNA-GFP nos insetos foi confirmada por RT-PCR, demonstrando a presença do dsRNA-GFP (Figura 6B).

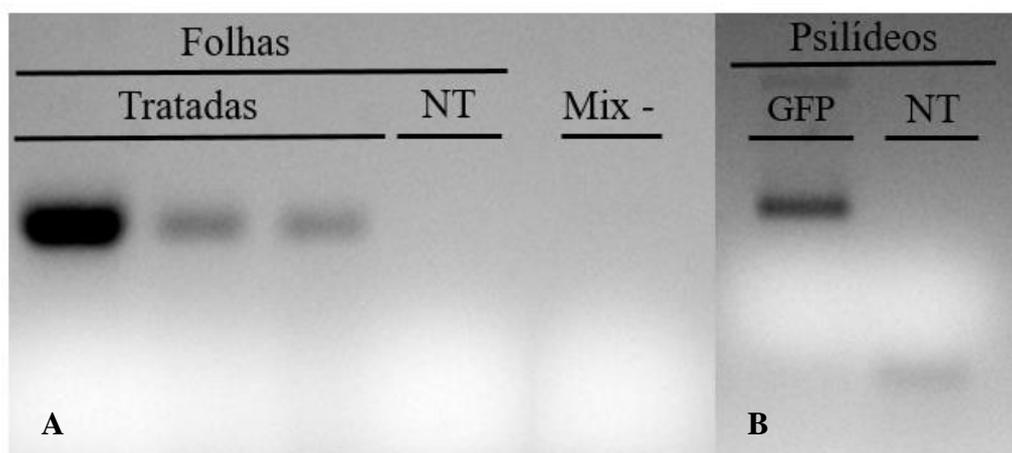


Figura 6. Detecção de dsRNA no tecido da folha e inseto. (A) Amplificon's testando positivo para presença do dsRNA-Wd-L em tecidos foliar após 24 horas de tratamento. NT, não tratada. Mix - (Reação RT-PCR controle). (B) Amplificon testando positivo para a presença do dsRNA-GFP nos tecidos de insetos que se alimentaram nas brotações tratadas. NT, não tratada.

Comportamento do psílídeo em testes de livre escolha

Os resultados destes bioensaios demonstraram não haver diferença estatística no número médio diário de insetos que se alimentaram em brotações tratadas com dsRNA-Ak, dsRNA-Wd-L (Figura 7, Tabela 2, Anexo I), dsRNA-GFP e dsRNA-GF em comparação às não tratadas (Figura 8, Tabela 2, Anexo I). Esses dados indicam que a presença destas moléculas de dsRNA nas brotações não influenciou o processo de escolha do psílídeo. Entretanto, quando as brotações continham o dsRNA-Trehal, observou-se diferença significativamente superior no número médio de insetos presentes nas brotações tratadas comparada às não tratadas (Figura 9, Tabela 2, Anexo I). Esses dados indicam a possibilidade que a ingestão destes dsRNAs possa estar interferindo a seleção de hospedeiro do psílídeo.

Após avaliação dos dados, constatou-se diferença significativa no experimento controle (Figura 9, Tabela 2, Anexo 1), porém todas as brotações foram tratadas apenas com água. Portanto, é possível inferir que outros fatores possam influenciar na permanência do inseto num dado sitio de alimentação.

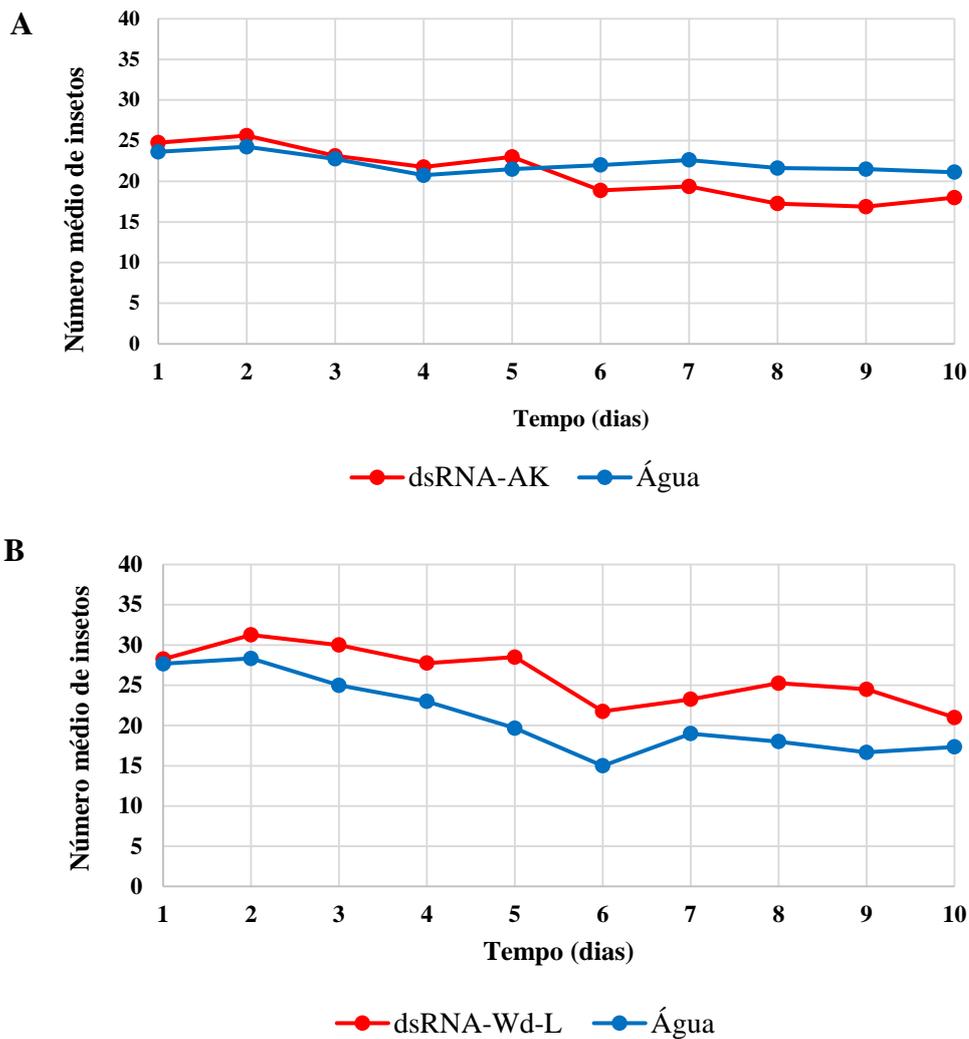


Figura 7. Número médio diário de insetos por tratamento em um período de dez dias. (A) F_c para tratamento (F_c) = 1,32, $p > 0,25$. (B) F_c = 1,47, $p > 0,23$. Não houve diferença estatística no número médio de insetos que se alimentaram em brotações tratadas em comparação às não tratadas, a 5% de probabilidade.

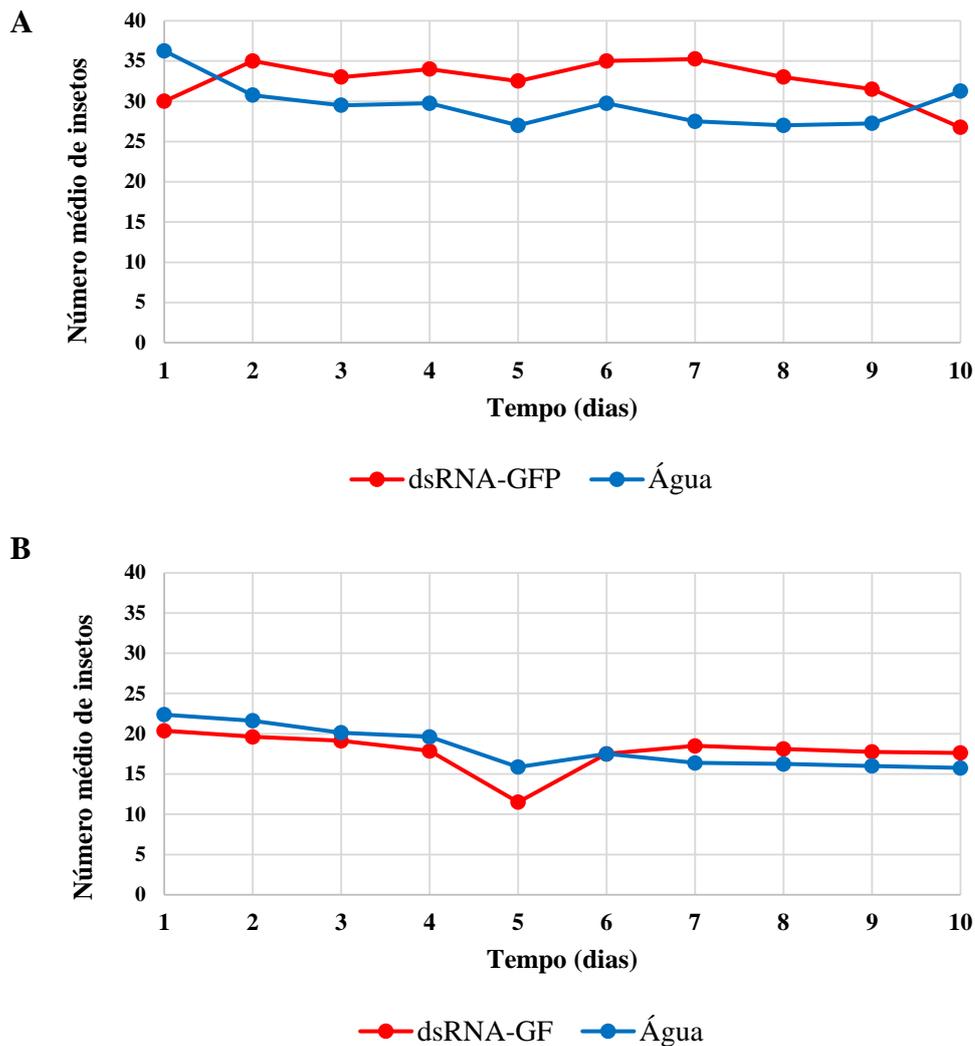


Figura 8. Número médio diário de insetos por tratamento em um período de dez dias. (A) F_c para tratamento (F_c) = 0,93, $p > 0,34$. (C) F_c = 0,23, $p > 0,63$. Não houve diferença estatística no número médio de insetos que se alimentaram em brotações tratadas em comparação às não tratadas, à 5% de probabilidade.

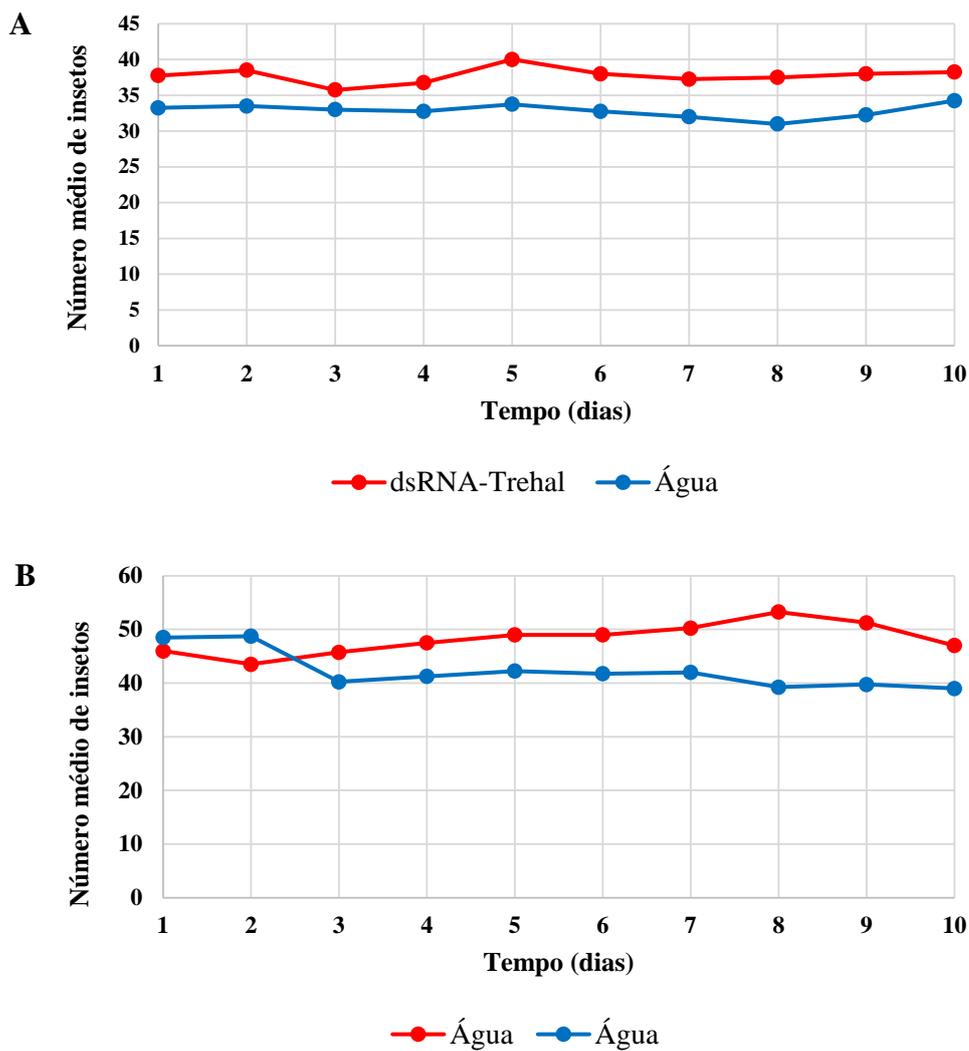


Figura 9. Número médio diário de insetos por tratamento em um período de dez dias. (A) $F_t = 12,07$, $p < 0,01$. (B) $F_t = 4,40$, $p < 0,04$. Houve diferença significativamente superior no número médio de insetos presentes nas brotações tratadas comparada às não tratadas, à 5% de probabilidade.

Discussão

As estratégias para o controle de insetos sugadores utilizando o mecanismo de RNAi são promissoras, e sua utilização se assemelha ao uso de inseticidas sistêmicos. São solúveis em água e após aplicados na planta podem ser absorvidos pelos tecidos da planta e translocados para outros tecidos, podendo permanecer por longos períodos afim de exercer suas devidas funções (JESCHKE et al., 2011; SÁNCHEZ-BAYO et al., 2013). O dsRNA pode funcionar também como inseticida de contato, pois quando pulverizado sobre as folhas, parte das moléculas permanecem na superfície das mesmas.

Bonani et al. (2010) verificaram que a alimentação de *D. citri* pode ocorrer tanto nos tecidos do xilema quanto do floema. Ebert et al. (2018) atestam que a preferência alimentar de *D. citri* via floema ocorre quando a mesma se encontra em tecido foliar imaturo (brotações e tecidos jovens) e via xilema quando em tecido foliar maduro.

No presente trabalho, a detecção dos dsRNA foi feita após 24 e 48 horas de tratamento nos tecidos da planta e insetos respectivamente. Andrade; Hunter (2017) demonstraram que é possível detectar a presença dessas moléculas em tecidos foliares após 40 dias e nos psilídeos foi possível detectar a presença do dsRNA 24 horas após alimentação na planta tratada. Após absorção do dsRNA pela planta, a molécula pode persistir no tecido vascular, tanto xilema quanto floema, por várias semanas (ANDRADE; HUNTER, 2017).

Não há registro de trabalhos publicados que avaliaram a resposta comportamental de *D. citri* em plantas contendo moléculas de dsRNA. Todavia, diversos trabalhos demonstram que o processo de escolha da hospedeira por *D. citri* pode ser influenciado por diversos fatores, como sinais químicos (compostos orgânicos voláteis – COV's), estágio de maturação do tecido foliar, sinais olfativos e gustativos (PATT et al. 2011; AMMAR; HALL; SHATTERS-JR, 2013; RUAN et al., 2015; HALL; HENTZ; PATT, 2015; EBERT et al., 2018).

Segundo Patt et al. (2011), a seleção de hospedeira por *D. citri* é influenciada por sinais visuais, olfatórios, e gustativos, enfatizando que mesmo pequenas alterações nesses estímulos, podem influenciar na resposta comportamental de *D. citri*. No presente trabalho, apesar de se observar um número superior de insetos nas brotações tratadas com o dsRNA-Trehal, é possível que as moléculas não exerçam atividade atrativa ao psilídeo. O dsRNA-Trehal tem a função de inibir a formação da enzima Trehalase, que segundo Ishaaya; Swirski (1976) e Sampedro; Uribe (2004), está associada ao processamento de

carboidratos, bem como ao metabolismo energético. Ao se alimentar, o inseto ingere o dsRNA-Trehal, neste sentido, é possível supor que o dsRNA irá promover a redução da expressão do gene da trehalase, resultando em uma baixa atividade metabólica, e consequentemente, sensação de “fome insaciável” e isso pode ter influenciado no maior número de psilídeos nas brotações tratadas.

Segundo Suzuki et al. (1999) e Taning et al. (2016), a proteína Argenina kinase também está associada ao metabolismo energético; e a função do dsRNA-Ak é inibir a formação desta proteína. As proteínas, Argenina kinase e Trehalase, apresentam atividade metabólicas similares, e apesar da relativa essencialidade do gene Ak, demonstrada por Taning et al. (2016) e Andrade; Hunter (2017), não houve diferença significativa entre os tratamentos propostos para esse bioensaio. A partir destes dados, é possível supor que outra proteína possa assumir a função da proteína Ak, dependendo do nível da redução da expressão, enquanto que a trehalase seja mais essencial ao inseto.

O dsRNA-Wd-L por sua vez, induz a redução da formação da proteína Wing-disc Like, e segundo El-Shesheny et al. (2013), está associada a formação das asas do psilídeo. Sua maior expressão ocorre durante o quinto estágio ninfal (quinto instar). A ingestão desse dsRNA por ninfas de *D. citri* promove o aumento da mortalidade e a má formação das asas nos adultos (EL-SHESHENY et al., 2013). Porém, para um adulto completamente formado, como no presente trabalho, é possível que ingestão do dsRNA não cause danos significativos em seu movimento alar. Logo, não foi possível observar que a presença do dsRNA tenha causado interferência na escolha de hospedeiro pelo inseto.

Porém, para o bioensaio controle, onde todas as brotações foram tratadas com água, detectou-se diferença significativa para o número médio diário de insetos se alimentado nas brotações avaliadas, indicando que a superioridade no número médio de insetos presentes nas brotações tratadas com dsRNA-Trehal, pode não ser em resposta à presença destas moléculas.

Os dsRNAs-GPF e dsRNA-GF não apresentam homologia a nenhuma gene do psilídeo, desta forma não devem causar nenhuma alteração na expressão gênica ao ser ingerido pelo inseto. No presente trabalho, não houve diferença significativa para o número médio diário de insetos que se alimentaram em brotações tratadas com ambos os dsRNAs. Andrade; Hunter (2017) demonstraram não haver mortalidade em grupos de psilídeos que se alimentaram em brotações tratadas com o dsRNA-GFP. Logo, a presença

das moléculas dsRNAs, GFP e GF, nas brotações não promovem resposta de atração ou repelência para o psilídeo.

Neste sentido, é possível supor que a diferença em alguns dos ensaios realizados nesse trabalho não seja ocasionada pela presença do dsRNAs nas brotações. Ao analisar o número médio de insetos ao longo dos dias, em todos os bioensaios é possível observar uma baixa variação em ambos os tratamentos. É possível observar um padrão quase linear no número médio de insetos ao longo dos dez dias de avaliação em todos os tratamentos realizados. Assim, infere-se que, ao estabelecer um sítio de alimentação, o psilídeo reduz a sua atividade de locomoção entre as brotações, permanecendo numa mesma brotação por vários dias.

Apesar da variação de resposta do inseto aos dsRNA (Threhal e Wd-L), os resultados indicam que a aplicação do dsRNA na planta não proporciona a repelência ao psilídeo, demonstrando que as moléculas introduzidas não alteram as características de atratividade dos citros.

Conclusões

A presença das moléculas de dsRNA-Ak, Wd-L, GFP e GF nas brotações de citros não altera o comportamento de seleção de hospedeira por *Diaphorina citri*, indicando que o inseto não possui a capacidade de perceber a presença do dsRNA nas brotações. Porém, a ingestão das moléculas de dsRNA, como ds-RNA-Theal, podem afetar funções metabólicas importantes para o psilídeo, implicando no maior número de insetos em brotações tratadas com dsRNA. Portanto, não há evidências que indiquem repelência da planta à *D. citri* devido à presença das moléculas de dsRNA.

Referências

- AMMAR, EL-DESOUKY; HALL, D. G.; SHATTERS JR, R. G. Stylet morphometrics and citrus leaf vein structure in relation to feeding behavior of the asian citrus psyllid *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing bacterium. **Plos One**, v. 8, p. 1-12, 2013.
- ANDRADE, E. C.; HUNTER, W. B. RNA Interference – natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC). **InTech**, Florida. v1, p. 391-409, 2016.
- ANDRADE, E. C.; HUNTER, W. B. RNAi Feeding bioassay: development of a non-transgenic approach to control asian citrus psyllid and other hemipterans. **The Netherlands Entomological Society**, v. 2, p. 389-396, 2017.
- AUBERT, B. Citrus greening disease, a serious limiting factor for citriculture in Asia and Africa. International Society of Citriculture, **Proceedings**, v.2, p. 817–820, 1992.
- BARROS, J. R. M. et al.; O mercado da citricultura no Brasil e nas suas novas perspectivas. **CITRUSBR**. 34 p. 2016.
- BASSANEZI, R. B; MONTESIMO, L. H; STUCHI, E. S.; Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.125, p. 565-572, 2009.
- BASTOS, D. C.; et al. Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuário**, v.35, p.36-45, 2014.
- BAUM, J. A. et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, New York. v. 25, p. 1322-1326, 2007.
- BELASQUE JR. et al.; Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas de assintomáticas de Huanglongbing (HLB, greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p. 137-145, 2009.
- BLACKWELL, P. *Diaphorina citri*. **EPP0 Bulletin**, Oxford, v.35, p. 331-333, 2005.

BOINA, D. R. et al. Quantifying dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae) by immune marking and potential impact of unmanaged groves on commercial citrus management. **Environmental Entomology**, v. 38, p. 1250-1258, 2009.

BONANI, J. P. et al. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **The Netherlands Entomological Society**, v. 134, p. 35-49, 2010.

BOVÉ, JOSEPH-MARIE. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**. Pisa, v. 88, p. 7-37, 2006.

CARMELL, M. A. et al. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 16, p. 2733-2742, 2002.

CHAVAN, V. M.; SUMMANWAR, A. S. Population dynamics and aspects of the biology of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuw., in Maharashtra. **International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings**, v. 12, p. 286-290, 1993.

CHAVEZ, Y. et al. *Tamarixia radiata* (Waterston) and *Cheilomenes sexmaculata* (Fabricius) as biological control agents of *Diaphorina citri* Kuwayama in Ecuador. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 77, p. 180-184, 2017.

COLETTA-FILHO, H. D. et al. First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, p. 1382-1382, 2004.

COLETTA-FILHO, H. D. et al. In planta multiplication and graft transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ revealed by real-time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, p. 53-60, 2010.

DA GRAÇA, J.V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 109-136, 1991.

DONADIO, L. C.; STUCHI, E. S.; CYRILLO, F. L. de L. Tangerinas ou mandarinas. **Boletim Citrícola**. Jaboticabal: Funep, 40 p. 1998.

EBERT, T. A. et al. Behavioral plasticity in probing by *Diaphorina citri* (Hemiptera, Liviidae): ingestion from phloem versus xylem is influenced by leaf age and surface. **Springer**, v. 10, p. 1-19, 2018.

EL-SHESHENY, I. et al. Silencing abnormal Wing Disc gene of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* disrupts adult wing development and increases nymph mortality. **Plos One**, v. 8, p. 1-8, 2013.

ETXEERRIA, E. et al. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.74, p. 76-83, 2009.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Citrus fruit - fresh and processed statistical bulletin 2016**, 77 p. 2017.

FIRE, A. Z. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

FIRE, A. Z. Gene silencing by double-stranded RNA. **Angewandte Chemie**, v. 46, p. 6966-6984, 2007.

FUNDECITRUS. **Greening (HLB)**. São Paulo: Fundo de Defesa da Citricultura, 12 p. 2009.

FUNDECITRUS. **Curso de gestão estratégica de HLB: Métodos para dar um xeque-mate na doença**. 2017a. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/pdf/palestras/CursoZHLBZ2016.pdf>>. Acesso em: 07 ago. 2018.

FUNDECITRUS. **Greening causou incremento de 85% nos custos de produção de citros da Flórida (EUA)**. 2017b. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/greening-causou-incremento-de-85-nos-custos-de-producao-de-citros-da-florida-eua/556>>. Acesso em: 07 ago. 2018.

FUNDECITRUS. **Levantamento de doenças dos citros: HLB, CVC e cancro cítrico no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste mineiro 2017**. São Paulo: São Paulo: Fundo de Defesa da Citricultura, 54p. 2017c.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J. M. Etiology of citrus greening disease. **Annales de Microbiologie**, Paris, v.153, p. 169-179, 1984.

GOTTWALD, T. R. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**. v. 48, p. 119-139, 2010.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryo, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. **Cell Press**, v. 81, p. 611-620, 1995.

HEAD, G. P. et al. Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. **Pest Management Science**, v. 73, p. 1883-1899, 2017.

HALBERT, S. E. et al. Incidence of Huanglongbing-associated ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) collected from Plants for Sale in Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v.95, p. 617-624, 2012.

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**, v.87, p. 330-353, 2004.

HALL, D. G. **Biology, history and word status of *Diaphorina citri***. Fort Pierce: USDA-ARS, 11 p. 2008.

HALL, D. G. et al. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 146, p. 207–223, 2012.

HALL, D. G.; HENTZ, M. G.; PATT, J. M. Behavioral assay on asian citrus psyllid attraction to orange jasmine. **Springer**, v. 28, p. 555-568, 2015.

HÖCK, J.; MEISTER, G. The Argonaute protein family. **Genome Biology**, v. 9, p. 1-8, 2008.

HOLLIS, D. A new citrus-feeding psyllid from the Comoro Islands, with a review of the *Diaphorina amoena* species group (Homoptera). **Systematic Entomology**, v.12, p. 47–61, 1987.

HUNG, T. H.; et al. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. **Plant Pathology**, v. 53, p. 96–102, 2004.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) – SIDRA. **Produção agrícola municipal**, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

ISHAAYA, I.; SWIRSKI, E. Trehalase, Invertase, and Amylase activities in the black scale, *Saissetia oleae*, and their relation to host adaptability. **Journal of Insect Physiology**, v. 22, p. 1025-1029, 1976.

JAGOEIX, S.; BOVE, J. M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the a subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.44 p. 397-486, 1994.

JESCHKE, P. et al. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2897-2908, 2011.

KIST, B. B. et al. Internacional citrus congress, 2016, Foz do Iguaçu. **Anuário brasileiro de citros 2016**. Santa Cruz do Sul: Gazeta, 64 p. 2016.

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**, v. 137, p. 201–206, 2000.

LOPES, S. A. et al. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. **European Journal of Plant Pathology**, v.119, p.463-468, 2007.

MANN, R. S. et al. Induced release of a plant-defense volatile ‘deceptively’ attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. **Plos Pathogens**, v. 8, p. 1-13, 2012.

MAO, YING-BO et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1307–1313, 2007.

MEAD, F.W.; FASULO, T. R. **Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Insecta: Hemiptera: Psyllidae)**. Gainesville, University of Florida (IFAS Extension, 33). 8 p. 2011.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, p. 343–349, 2004.

MICHAUD, J. P. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. **Biological Control**, v. 29, p. 260-269, 2004.

MLOTSHWA, S. et al. RNA silencing and the mobile silencing signal. **The plant Cell**, v. 14, p. 289-301, 2002.

MORRIS, K. V. et al. Small interfering RNA–induced transcriptional gene silencing in human cells. **Science**, v. 305, p. 1289-1292, 2004.

MURRAY, R. G. E.; SCHLEIFER, K. H. Taxonomics notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p. 174-176, 1994.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, v.2 p. 279-89, 1990.

NEVES, M. F. et al. **O Retrato da citricultura brasileira**. NEVES, M. F. (Coord.). 1. ed. Ribeirão Preto: Markestrat, 138 p. 2010.

NEVES, M. F. et al. **A laranja do campo ao copo**. São Paulo: Atlas. 218 p. 2012.

PARRA, J. R. P. et al. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao Huanglongbing. **Citrus Research and Technology**, v. 31, p. 37-51, 2010.

PATT, J. M. et al. Multimodal cues drive host-plant assessment in asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*). **Environmental Entomology**, v. 40, p. 1494-1502, 2011.

PELZ-STELINSKI, K. S. et al. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Economical Entomology**, v. 103, p. 1531-1541, 2010.

PORTALANZA, D. E. et al. First records of parasitoids attacking the asian citrus psyllid in Ecuador. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 61, p. 107-110, 2017.

PRICE, D. R.G.; GATEHOUSE, J. A. Rnai-mediated crop protection against insects. **Cel Press**. Durham, v. 26, p. 393-400, 2008.

RAITHORE, S. et al. Effect of blending Huanglongbing (HLB) disease affected orange juice with juice from healthy orange on flavor quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 868–874, 2015.

RIVAS, F. V. et al. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, p. 340-349, 2005.

ROBINSON G. E. et al. Creating a buzz about insect genomes. **Science**, v. 331, p. 1386-1386, 2011.

ROGERS, M. E.; STANSLY, P. A. **Biology and management of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, in Florida Citrus.** Gainesville, University of Florida (IFAS Extension, ENY-739). 6 p. 2012.

ROISTACHER, C. N. **Techniques for biological detection of specific citrus graft transmissible diseases.** FAO, p. 35-45, 1991.

RUAN, CHUAN-QING et al. Host-Choice behavior of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) under laboratory conditions. **Springer**, v. 28, p. 138-146, 2015.

RUIZ-GALVÁN, I. et al. Control químico de *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae) en Lima Persa. **Acta Zoológica Mexicana**, v. 31, p. 41-47, 2015.

SAMPEDRO, J. G.; URIBE, S. Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 256/257, p. 319-327, 2004.

SÁNCHEZ-BAYO, F. et al. Impact of systemic insecticides on organisms and ecosystems. **Intech Open Science**, p. 367-416, 2013.

SECHLER, A. et al. Cultivation of '*Candidatus* L. africanus' and '*Candidatus* L. americanus' associated with Huanglongbing. **Phytopathology**, v. 99, p. 480-486, 2009.

SPANN, T. M. et al. IFAS guidance for huanglongbing (greening) management. **Citrus Industry**, V. 91, p. 6-13, 2010.

SUZUKI, T. et al. Arginine kinase evolved twice: evidence that echinoderm arginine kinase originated from creatine kinase. **Biochemical Journal**, v. 340, p. 671-675, 1999.

TANING, C. N. T. et al. Asian Citrus Psyllid RNAi Pathway – RNAi evidence. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-10, 2016.

TEIXAIRA, D. C. et al. '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p. 1857-1862, 2005.

TOMARI, Y.; ZAMORE, P. D. Perspective: machines for RNAi. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 19, p. 517-529, 2005.

TSAI, J. H., & LIU, Y. H. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on Four Host Plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 1721-1725, 2000.

TSAI, J. H.; WANG, J.J.; LIU, Y. H. Seasonal abundance of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Southern Florida. **Florida Entomologist**, v. 85, p. 446-451, 2002.

VAN DER KROL, A. R. et al. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **The Plant Cell**, v. 2, p. 291-299, 1990.

WANG, Y. et al. Second-generation sequencing supply an effective way to screen rna targets in large scale for potential application in pest insect control. **Plos One**, v. 6, p. 1-10, 2011.

WENNINGER, E. J.; HALL, D. G. Daily timing of mating and age at reproductive maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, v. 90, p.715-722, 2007.

WENNINGER, E. J.; HALL, D. G. Daily and seasonal patterns in abdominal color in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 101, p. 585-592, 2008.

WHYARD, S.; SINGH, A. D.; WONG, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. **Elsevier**, v. 39, p. 824-832, 2009.

YAMAMOTO, P. T.; PAIVA, P. E. B.; GRAVENA, S. Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 165-170, 2001.

YAMAMOTO, P. T. et al. Eficácia de Inseticidas para o Manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: psyllidae) em Citros. **Sociedade Entomológica do Brasil**, v.4, p. 1-9, 2009.

YI, R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes & Development**, v. 17, p. 3011-3016, 2003.

Anexo I

Tabela 2. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fc para tratamento. Gl = Graus de liberdade. CV = coeficiente de variação.

Bioensaios	Fc	Pr>Fc	Gl	CV (%)	Médias		Erro padrão
					dsRNA	Água	
dsRNA-Ak vs Água	1,32	0,25	1	33,68	20,86	22,18	0,81
dsRNA-Wd-L vs Água	1,47	0,23	1	33,59	26,15	23,88	1,33
dsRNA-GFP vs Água	0,93	0,34	1	44,63	32,60	29,60	2,19
dsRNA-GF vs Água	0,23	0,63	1	25,54	17,80	18,15	0,51
dsRNA-Trehal vs Água	12,07	0,00	1	17,96	37,78*	32,85*	1,00
Água vs Água	4,40	0,04	1	28,14	48,25* ¹	42,28*	2,01

¹ As brotações foram tratadas com água, mas para fins de análise, foram divididas em tratadas e não-tratadas.

* Médias na mesma linha diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.