



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Instituto de Biologia**

**DOUTORADO**

**DIOGO MANZANO GALDEANO**

**AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS EM  
SISTEMA DE RNA INTERFERENTE (RNAi) EM *DIAPHORINA CITRI*  
(KUWAYAMA) (HEMIPTERA: LIVIIDAE), VETOR DO  
*HUANGLONGBING* DOS CITROS**

**EVALUATION OF CANDIDATE GENES EXPRESSION IN RNA  
INTERFERENCE SYSTEM (RNAi) IN *DIAPHORINA CITRI*  
(KUWAYAMA) (HEMIPTERA: LIVIIDAE), VECTOR OF CITRUS  
*HUANGLONGBING***

**Campinas, 2016**

**DIOGO MANZANO GALDEANO**

**Avaliação da expressão de genes candidatos em sistema de RNA  
interferente (RNAi) em *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera:  
Liviidae), vetor do *huanglongbing* dos citros**

**Evaluation of candidate genes expression in RNA interfering system (RNAi)  
in *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae), vector of citrus  
*huanglongbing***

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Genética e Biologia Molecular, na  
área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Thesis presented to the Biology Institute of the  
University of Campinas as partial fulfillment  
of the requirements for the degree of Doctor in  
Genetic and Molecular Biology, in the area of  
Genetics and Plant Breeding.

**Orientador: MARCOS ANTONIO MACHADO**

**Campinas, 2016**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/02138-0

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G131a Galdeano, Diogo Manzano, 1983-  
Avaliação da expressão de genes candidatos em sistema de RNA interferente (RNAi) em *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae), vetor do *huanglongbing* do citros / Diogo Manzano Galdeano. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Marcos Antonio Machado.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Diaphorina citri*. 2. Interferência de RNA. 3. *Huanglongbing*. I. Machado, Marcos Antonio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of candidate genes expression in RNA interfering system (RNAi) in *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae), vector of citrus *huanglongbing*

**Palavras-chave em inglês:**

*Diaphorina citri*

RNA Interference

Greening disease

**Área de concentração:** Genética Vegetal e Melhoramento

**Titulação:** Doutor em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Marcos Antonio Machado [Orientador]

Henrique Marques Souza

Katlin Brauer Massirer

Ricardo Harakava

Tiago Campos Pereira

**Data de defesa:** 30-08-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas, 30 de agosto de 2016.

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Marcos Antonio Machado

Prof. Dr. Henrique Marques Souza

Profa. Dra. Katlin Brauer Massirer

Prof. Dr. Ricardo Harakava

Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

## **Dedico**

Aos meus pais Duilio e Helena,

Ao meu irmão Lívio,

À minha companheira Laís,

Por todo incentivo e amor

“Ninguém baterá tão forte quanto a vida. Porém, não se trata de quão forte pode bater, se trata de quão forte pode ser atingido e continuar seguindo em frente. É assim que a vitória é conquistada. ”

Rocky Balboa

## AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/Instituto Agrônomo de Campinas/SP, pela oportunidade de realizar este trabalho;

À Universidade Estadual de Campinas pelos conhecimentos construídos durante as disciplinas;

Ao meu orientador, Dr. Marcos A. Machado, pela dedicação, atenção, amizade, paciência, pelo auxílio, incentivo e pelos conhecimentos que me ensinou durante todo o trabalho;

Ao Prof. Dr. Roberto João Spotti Lopes por ter me auxiliado com seus conhecimentos e ter cedido a colônia de *Diaphorina citri* para que eu pudesse dar início a este trabalho;

Ao Prof. Dr. Bryce Falk por ter me aceitado no Departamento de Plant Pathology da Universidade da Califórnia-Davis durante o período de Doutorado Sanduíche e pelo auxílio, ensinamentos e amizade que serão para sempre;

À Dr<sup>a</sup>. Michele Claire Breton, pelas horas de ensino de bioinformática, além da amizade desde o início desta jornada;

À Msc. Juliana Balbinotte que me ensinou toda a metodologia para estabelecer criação de *D. citri* em laboratório;

À Maria de Lourdes Fagundes, secretária do Programa de Pós-Graduação da Genética e Biologia Molecular, por prestar todos os auxílios burocráticos;

Ao Dr. Marcos C. Gonçalves e à Dr<sup>a</sup>. Sylvia D. Guzzo pelo apoio em toda minha carreira e amizade;

Aos pesquisadores do laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Alessandra de Souza, Helvécio Coletta, Marco Takita, Valdenice Novelli, Juliana Astúa, Raquel Boscariol, Mariangela Cristofani-Yaly;

Aos funcionários Kleber Borges, Anita e Rose por sempre estarem prontos a nos prestar auxílio no laboratório de Biotecnologia;

Aos amigos: Theresa de Oliveira, Patrícia Hassato, Carolina Krebs, Carolina Valenzuela (Batuta), Filipe Gomes, Rodrigo Bina, Roberto Ruy Sauer, Gabriel Vaz, Gustavo Leite, Ciro Rovani, Marcos Lima e Evandro Duarte pelos anos de apoio, descontração e amizade;

Aos amigos do Centro de Citricultura: Laura, Inaiara, Tiago, Cintia, Emilyn, Rosinha, Gabriela, Paulo, Eduardo, Francisco, Tatiane, Luciane, Silvia, Amanda, Diogo Maciel, Carolina Sardinha, Danila, Simone, Bárbara, Fausto, Marcus, Pedro, Juarez, Juliana Pereira que me ensinaram, alegraram e acompanharam na aventura deste trabalho;

Aos amigos “internacionais”: Jingjing Li, Yen-Wen, Inma Ferriol, Jared, Marc, Jeremy, Raja, Erika, Alyssa, DJ, Nancy, Michael, Roger, Francesco, Shahideh, Wendy, Laura, Ana, Bharathi, Francis, Karla, Yaxin, Pepê, Branko, Susan, Livingston e Shay por me mostrarem como são as culturas que existem no mundo e que cada um deve respeitar os pensamentos e ideais do próximo;

Aos amigos *housemates*: Nielson, Fernando, Rafael, Letícia, Luís, André e Vitor pelos momentos de filosofia e risadas;

À amiga conselheira Patrícia Lima, pela amizade, alegria, loucuras, zueiras, “força esquerdista”, conversas sobre qualquer tema e total confiança em mim.

À Erica Pedro que me ensinou como devemos aproveitar cada momento da vida e lutar sempre por nossos sonhos... onde você estiver, muito obrigado;

À Laís por ser uma grande companheira em todos os momentos, pela paciência, pelas risadas, ensinamentos, carinho, cozinhar tão bem, por me incentivar em tudo o que faço e me iluminar com todo o seu amor;

Aos meus pais, Duilio e Helena, e ao meu irmão, Lívio, pelo apoio, companheirismo, amor, conhecimento, pela compreensão, coragem, alegria, confiança, sabedoria e amizade;

Ao INCT pelo apoio financeiro para a realização dessa tese. Para a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado e doutorado sanduíche que me permitiu desenvolver parte desse trabalho na Universidade da Califórnia, Davis

## RESUMO

O psílídeo *Diaphorina citri* (Kuwayama) tornou-se nos últimos anos um dos mais importantes vetores na cultura de citros, em função dos crescentes prejuízos causados às plantas pela transmissão das bactérias *Candidatus Liberibacter americanus* e *Candidatus Liberibacter asiaticus*, agentes causais do *huanglongbing* (HLB) dos citros. O manejo do HLB é baseado no uso de mudas sadias, erradicação de plantas infectadas e pelo controle químico do vetor. No entanto, o uso contínuo e intenso de inseticidas é problemático, não só pelos custos financeiros, como também pelos problemas ambientais que o uso excessivo acarreta. Para reduzir os altos custos no desenvolvimento de novos inseticidas e tornar o controle mais eficiente e específico, o silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) é uma das promessas de novas tecnologias utilizadas no controle de pragas e vetores. Assim, os objetivos deste trabalho foram buscar genes candidatos a serem silenciados, estabelecer sistemas de fornecimento de moléculas de dupla fita de RNA (dsRNAs), avaliar a mortalidade e expressão dos genes candidatos a silenciamento de *D. citri*. Para isso, foi utilizado um sistema de alimentação *in vitro* composto por diferentes concentrações de sacarose para avaliar a sobrevivência de *D. citri* nos estágios de ninfa e adultos durante cinco dias. Foi realizada a busca de 16 genes candidatos no transcriptoma e genoma de *D. citri*. Depois da confirmação das sequências, os genes *inhibitor of apoptosis*, *trehalase*, *cathepsin D*, *cathepsin L*, *chitin synthase*, *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase subunit-A* e *ATP synthase subunit-D like mitochondrial* foram selecionados para serem transcritos *in vitro* e três diferentes concentrações de dsRNAs (200, 500 e 1000 ng.µL<sup>-1</sup>) de cada gene foram incorporadas em dieta artificial para insetos adultos. Também foi elaborado um sistema de fornecimento de dsRNAs de *inhibitor of apoptosis*, *cathepsin D* e *chitin synthase* via ramos de *Murraya* spp. para avaliar os efeitos de RNAi em ninfas. Nos ensaios de ingestão de dsRNAs via dieta artificial e ramos de murta foram avaliados a taxa de mortalidade e expressão gênica dos insetos, e também, a estabilidade dos dsRNAs. As concentrações 15 e 30% de sacarose no sistema de alimentação *in vitro* foram as que apresentaram maiores taxas de sobrevivência de *D. citri* adultas das populações estabelecidas no Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’/IAC e na Universidade da Califórnia-Davis, respectivamente. Após cinco dias, as taxas de mortalidade nos testes de fornecimento de dsRNAs dos genes alvos de *D. citri* em dieta artificial variaram entre 21-48%, 28-51% e 37-63%, nas concentrações 200, 500 e 1000 ng.µL<sup>-1</sup>, respectivamente. As taxas de sobrevivência de ninfas no sistema de fornecimento de dsRNAs de *inhibitor of apoptosis*, *cathepsin D* e *chitin synthase* via planta foram de 40, 71 e 50%, respectivamente. As moléculas de dsRNAs foram estáveis nos sistemas de fornecimento avaliados. Além disso, reduções nos níveis de expressão dos genes alvo de *D. citri* nos ensaios



de RNAi foram confirmadas por PCR em tempo real. Estes dados sugerem métodos de fornecimento de dsRNAs, dieta artificial e ramos de murta, são ferramentas úteis para estudos de função gênica e possível controle de *D. citri*.

## ABSTRACT

In early years, the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Kuwayama) has become one of the most important vectors in citrus, due to the increasing damage caused to plants by bacteria transmission, *Candidatus Liberibacter americanus* and *Candidatus Liberibacter asiaticus*, causal agents of citrus huanglongbing (HLB). Healthy seedlings, eradication of infected plants and the chemical control of the vector have been used as HLB control strategies. However, the use constant and intensive of insecticides is not a good strategy, not only to the financial costs but also to the environmental problems. To reduce the high costs in development the new insecticides and making the control more efficient and specific, the gene knockdown by RNA interference (RNAi) is one of the promises of new technologies used in the control of pests and vectors. The aims of this study were to development double-stranded RNA (dsRNAs) delivery systems, searching candidate genes to be knockdown, evaluate the mortality and gene expression of *D. citri*. Thus, an *in vitro* feeding system composed of different sucrose concentrations was used to evaluate the nymph and adult *D. citri* survival for five days. After that, sixteen candidate genes were searching in transcriptome and genome *D. citri*. After confirmation of gene sequences, *inhibitor of apoptosis*, *trehalase*, *cathepsin D*, *cathepsin L*, *chitin synthase*, *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase subunit-A* e *ATP synthase subunit-D like mitochondrial* genes were selected to be transcripts *in vitro*, and three different dsRNAs concentrations (200, 500 e 1000 ng.µL<sup>-1</sup>) of each gene were put in artificial diet to adult insects. Moreover, a dsRNAs (*inhibitor of apoptosis*, *cathepsin D* *chitin synthase*) delivery system by *Murraya* spp. leaves was development to evaluate the RNAi effects in nymphs. Mortality rates and gene expression of *D. citri* were evaluated after feeding dsRNAs via artificial diet and *Murraya* spp., and also, the dsRNAs stability in both delivery systems were evaluated. Fifteen and thirty percent sucrose *in vitro* feeding system showed the highest survival rates of adult *D. citri* populations from Citrus Center 'Sylvio Moreira' /IAC and University of California-Davis, respectively. After five days, the *D. citri* mortality rates in the dsRNAs delivery system of target genes on artificial diets ranged from 21-48%, 28-51% and 37-63% at concentrations of 200, 500 and 1000 ng.µL<sup>-1</sup>, respectively. Nymphs survival rates in the delivery system of *inhibitor of apoptosis*, *cathepsin D* and *chitin synthase* dsRNAs via plant leaves were 40, 71 and 50%, respectively. DsRNAs molecules were stable in the delivery systems evaluated. Furthermore, reduction in target gene expression levels of *D. citri* in the RNAi assays were confirmed by real time PCR. These datas suggest methods of providing dsRNAs, artificial diet and orange jasmine leaves, are useful tools for gene function studies and possible control of *D. citri*.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	6
RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	10
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	13
1.1. Importância econômica da citricultura .....	13
1.2. <i>Huanglongbing</i> .....	14
1.3. <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama (Hemiptera: Liviidae).....	16
1.4. Silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi).....	19
1.5. RNAi em insetos.....	20
1.6. Genes candidatos para estudos de RNAi em insetos .....	22
2. HIPÓTESE .....	28
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Geral.....	28
3.2. Específicos .....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. Criação e manutenção dos insetos .....	28
4.2. Dieta artificial para <i>D. citri</i> em sistema de alimentação <i>in vitro</i> .....	30
4.3. Extração RNA total de <i>D. citri</i> .....	31
4.4. Obtenção das sequências dos genes alvos e projeção de <i>primers</i> específicos.....	31
4.5. Amplificação e sequenciamento de genes alvos.....	34
4.6. Síntese de dsRNAs.....	34
4.7. Bioensaio de RNAi em sistema de alimentação para <i>D. citri</i> .....	35
4.8. Estabilidade de dsRNAs em solução de dieta artificial .....	36
4.9. Desenvolvimento de método de silenciamento de genes por alimentação de dsRNAs via planta.....	36
4.10. Detecção da estabilidade de dsRNAs nos tubos e nas folhas <i>Murraya spp</i> .....	37
4.12. Análise estatística .....	40
5. RESULTADOS .....	40
5.1. Criação e manutenção dos insetos .....	40
5.2. Seleção de dieta artificial para <i>D. citri</i> em sistema de alimentação <i>in vitro</i> .....	42
5.3. Validação de <i>primers</i> específicos e síntese de dsRNAs .....	47

5.4. Avaliação dos efeitos de dsRNAs em dieta artificial para <i>D. citri</i> .....	50
5.5. Avaliação da estabilidade de dsRNAs em solução dieta artificial.....	55
5.6. Avaliação da expressão de genes de <i>D. citri</i> após ingestão de dsRNAs em dieta artificial.....	56
5.7. Estabilidade de moléculas de dsRNAs em solução e nas folhas de <i>Murraya spp.</i> .....	60
5.8. Avaliação da sobrevivência de ninfas de <i>D. citri</i> em ramos de <i>Murraya spp.</i> .....	61
5.9. Avaliação da expressão de genes de <i>D. citri</i> após ingestão de dsRNAs em ramos de murta .....	62
6. DISCUSSÃO .....	63
7. CONCLUSÕES .....	70
8. REFERÊNCIAS .....	70
ANEXO I - Artigo em processo de publicação.....	86
ANEXO II – Declaração de direitos autorais .....	110
ANEXO III – Declaração de bioética.....	111

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Importância econômica da citricultura

A citricultura está distribuída em todo o mundo e atualmente a China é o maior produtor mundial de citros com 648 milhões de caixas (40,8 kg) na safra de 2013, em uma área em 2,11 milhões de hectares. O Brasil que ocupa a segunda posição, produziu 19 milhões de toneladas de citros na safra de 2013/2014, que corresponde a 15% da produção mundial, sendo 17 milhões de toneladas de laranjas, 1,1 milhão de toneladas de limões e 900 mil de toneladas de tangerinas, segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO). Além disso, o país é o principal produtor de laranja, responsável por cerca de 30% do volume de produção mundial da fruta (FAO, 2015) e produção estimada em 15 milhões de toneladas na safra de 2016 de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (IBGE, 2016) (<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/>). O Brasil é também o principal exportador mundial de suco de laranja, tanto de suco concentrado congelado (FCOJ) quanto não concentrado (NFC) (USDA, 2016), sendo a Europa o principal destino dessas exportações. A produção brasileira equivale a metade do suco de laranja do planeta cujas exportações movimentam de US\$ 1,5 bilhão a US\$ 2,5 bilhões por ano (NEVES, 2010).

O principal parque citrícola do Brasil engloba 349 municípios dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. A estimativa de produção comercial é de 245,74 milhões de caixas de 40,8 Kg de laranja na safra de 2016/2017. A área com pomares de laranja, incluindo todas as variedades, é de 416 mil hectares e deste total, mais de 90% do cinturão citrícola são formados por quatro variedades: Pera Rio, que lidera com 35% das árvores, seguida de Valência (29%), Hamlin (12%) e Natal (11%) (FUNDECITRUS, 2016). De acordo com a Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo (SAA/SP, 2016), a citricultura é considerada a cultura que mais absorve trabalhadores temporários por hectare no Estado de São Paulo, porém, recentemente, foram observadas mudanças significativas na estrutura do setor citrícola paulista. De acordo com o IBGE (IBGE, 2016) a área total de laranja plantada diminuiu em 12,4% entre os anos de 2012 e 2013 no Estado de São Paulo, assim como houve também redução no número de citricultores na principal região citrícola do país gerando diminuição na rentabilidade do setor comparada a de outras culturas, principalmente a de cana-de-açúcar.

Além destes fatores, a citricultura nacional tem se mostrado bastante vulnerável aos diversos problemas fitossanitários que tem surgido ao longo de sua história, por exemplo, fatores abióticos, como maiores períodos de estiagem, e bióticos, com ocorrência de pragas e doenças, os quais são responsáveis por grandes perdas para a cultura. Dentre as principais

doenças com grande impacto econômico para a citricultura brasileira destacam-se a clorose variegada dos citros (CVC) e o cancro cítrico, que têm como agente causal as bactérias *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, respectivamente (BELASQUE JÚNIOR et al., 2005; LARANJEIRA et al., 2008); a leprose dos citros, transmitida pelo ácaro *Brevipalpus yothersi* e o vírus da tristeza dos citros (CTV) que são consideradas as principais viroses que afetam a citricultura brasileira (AGUILAR; JUNIOR; GIROTTO, 1999; FREITAS-ASTÚA et al., 2007); já a gomose e a podridão em raízes e radículas são doenças causadas por patógenos pertencentes ao gênero *Phytophthora* (MUNIZ; QUEIROZ; MENEZES, 2004). No entanto, atualmente, a doença dos citros que tem causado maior impacto na citricultura é o *huanglongbing* (BOVE et al., 2006).

### **1.2. Huanglongbing**

O *Huanglongbing* (HLB), anteriormente conhecida como Greening dos Citros, é considerado uma das mais sérias e devastadoras doenças dos citros em todo mundo (DA GRAÇA et al., 2016; GRAÇA, 1991). Foi descrito pela primeira vez na China em 1919 como ‘amarelecimento dos ramos’ e desde então, tem-se a sua expansão para diversos continentes, inclusive para o continente americano, onde estão presentes os dois maiores países produtores de laranja, Brasil e Estados Unidos (BOVE et al., 2006).

Os sintomas de HLB iniciam-se com manchas amareladas assimétricas no limbo foliar que contrastam com a cor verde normal das folhas, sintoma conhecido como mosqueado que tende ao amarelecimento completo ao longo do tempo. Como sintoma secundário, ramos da árvore infectada podem apresentar folhas diminutas e clorose similar a deficiência de zinco, ferro e manganês (BASSANEZI et al., 2010). Além disso, podem ocorrer floradas fora de época e intensa desfolha dos ramos afetados, progredindo para uma generalização de sintomas por toda a planta inclusive com seca e morte de ponteiros. Os frutos dos ramos afetados são menores com amadurecimento incompleto, desenvolvimento assimétrico em relação ao eixo central e sementes abortadas (BOVÉ; GARNIER, 2002; BOVE et al., 2006) (Figura 1). As primeiras avaliações quantitativas do dano do HLB em condições brasileiras mostraram plantas com 60% da copa com sintomas da doença, além de redução de 70% na produção de frutos (BASSANEZI et al., 2006).



**Figura 1:** Sintomas de HLB em plantas de laranja doce. Plantas com sintomas setorizados e distribuídos. Folhas com mosqueado. Frutos tortos e sementes abortadas. (Fotos: Marcos A. Machado).

A doença é causada por bactérias Gram negativas, restritas ao floema, pertencentes ao gênero *Candidatus Liberibacter* e à subdivisão  $\alpha$ -*Proteobacteria* e transmitidas pelos psíldeos *Diaphorina citri* (Kuwayama) e *Trioza erytreae* (Del Guercio), por enxertia (Lin, 1956) ou pela planta parasita *Cuscuta* spp (GARNIER; BOVÉ, 1993). Três espécies bacterianas estão associadas com o HLB em citros: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) e *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam). CLas é encontrada em todos os países afetados por HLB, exceto no continente africano. Já as formas CLaf e CLam são encontradas apenas na África e no Brasil, respectivamente. As formas CLas e CLam são transmitidas naturalmente por *D. citri*, enquanto o CLaf possui como vetor *T. erytreae* (BOVÉ, 2006). Essas bactérias não são restritas a citros e podem colonizar outras plantas como *Cleome rutidosperma*, *Pisonia aculeate*, *Trichostigma octandrum*, *Murraya paniculata* e *Clausena lansium* (IFTIKHAR et al., 2014).

A ultraestrutura das bactérias associadas ao HLB no floema demonstra que elas se apresentam como células únicas, e por serem pequenas (2  $\mu\text{m}$  de comprimento; 0,1 - 0,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro), podem passar livremente pelas placas crivadas, não formando agregados visíveis capazes de bloquear o floema (KIM et al., 2009). Entretanto, quando a planta é colonizada pela bactéria, observa-se aumento da expressão dos genes envolvidos com a síntese de proteína P e calose. Essas substâncias são depositadas nos poros da placa crivada, impedindo o transporte de fotoassimilados para órgãos-drenos como, folhas, flores, frutos e raízes (KOH et al., 2012). Com isso, ocorre o acúmulo de amido nos plastídeos, no parênquima vascular, em elementos

do floema e pecíolo (KIM et al., 2009). Essas alterações contribuem para o desenvolvimento dos sintomas da doença, levando a perdas significativas na produção e até à morte das plantas infectadas.

Uma vez infectada, o tempo para que os sintomas de HLB apareçam na planta varia de acordo com o genótipo, estado fisiológico, idade da planta, local, intensidade de infecção e época do ano. Estudos com plantas sintomáticas para o HLB envolvendo expressão gênica demonstraram que os genes envolvidos em diversas funções celulares, incluindo o metabolismo de carboidratos, respostas ao estresse biótico e abiótico, sinalização e fatores de transcrição, transporte de fotoassimilados, modificação e degradação de proteínas sofrem alterações significativas após a infecção com as bactérias CLas e CLam (ALBRECHT; BOWMAN, 2009; ALBRECHT; FIEHN; BOWMAN, 2016; BOAVA et al., 2011; MAFRA et al., 2013)

Considerando que, atualmente o HLB é uma das doenças mais severas para citricultura mundial, é de fundamental importância que o manejo adequado seja realizado, pela identificação e erradicação imediata das plantas infectadas, eliminando assim, fontes de inóculo nos pomares. Outras medidas de controle também são utilizadas como aquisição de mudas sadias, eliminação de plantas de murta (*Murraya* spp) e aplicação de inseticidas para o controle do inseto vetor (IFTIKHAR et al., 2014; JR. et al., 2010; JUNIOR et al., 2009). Vale ressaltar que as estratégias de manejo devem ser utilizadas em conjunto, uma vez que, adotando-as isoladamente, a chance de sucesso de controle da doença diminui. Dessa forma, com a rápida disseminação da doença, torna-se necessária a agregação de novas frentes de pesquisa, voltadas para o desenvolvimento de plantas tolerantes ou resistentes ao HLB ou também repelentes ao inseto vetor da bactéria (JUNIOR et al., 2009).

### **1.3. *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)**

O inseto *D. citri* foi por muitos anos considerado uma praga secundária de citros no Brasil, até o registro do HLB em 2004, quando passou a ser a mais importante praga da cultura, como tem sido em todas as regiões citrícolas em que ocorre no mundo. Originária, provavelmente, da Ásia, atualmente tem ampla distribuição geográfica nos continentes asiático (BOVE et al., 2006) e americano (HALBERT; NÚÑEZ, 2004).

Os hospedeiros naturais de *D. citri* são plantas da família Rutaceae, principalmente dos gêneros *Citrus* e *Murraya*. No entanto, existem apenas algumas plantas dessa família que o psíldeo é capaz de completar o seu desenvolvimento, como é o caso de laranja doce (*Citrus sinensis*), limão cravo (*C. limonia*), limão rugoso (*C. jambhiri*), laranja azeda (*C. aurantium*), pomelo (*C. paradisi*) e murta (*Murraya* spp) (LIU; TSAI, 2000; NAVA et al., 2007).



*D. citri* adultos medem de 2 a 3 mm de comprimento, têm coloração castanha e, geralmente, alimentam-se na face abaxial das folhas. Os adultos saltam ou voam pequenas distâncias quando perturbados e podem viver de um a dois meses à temperatura de 22°C, além disso, são menos ativos durante os períodos de maior atividade vegetativa (LIU; TSAI, 2000; TOMASETO; KRUGNER; LOPES, 2016). Segundo Nava et al. (2007), os adultos atingem maturidade sexual por volta de 10 dias após a emergência, sendo que as fêmeas podem colocar até 800 ovos durante o período de oviposição (NAVA et al., 2007). Os ovos são depositados em brotações novas e nas reentrâncias das folhas e apresentam-se em forma de amêndoas, com coloração amarelo-alaranjado. As ninfas são pequenas, achatadas dorso-ventralmente, de cor amarelo palha, e apresentam cinco instares. Elas permanecem grande parte do tempo agregadas e se alimentam das partes mais jovens da planta, como folhas novas, parte terminal do pecíolo, entre a gema axilar e em brotações (LIU; TSAI, 2000).

Embora possa causar danos à planta cítrica pela sucção de seiva e deformação foliar em brotos jovens quando em altas populações (HALBERT; NÚÑEZ, 2004; MICHAUD; OLSEN, 2004), *D. citri* tornou-se importante pela transmissão de bactérias fitopatogênicas do gênero *Candidatus Liberibacter*, associadas ao HLB. A aquisição de CaLas pode ocorrer tanto por ninfas (4º e 5º instares) como por adultos de *D. citri*, porém as ninfas adquirem com maior eficiência (NASCIMENTO, 2010). No entanto, indivíduos que adquirem o patógeno na fase ninfal são capazes de transmitir a bactéria após a ecdise para a fase adulta (INOUE et al., 2009), evidenciando que o patógeno é circulativo no vetor, não estando restrito ao estomodeu ou às peças bucais. Estudos demonstraram também, que machos contaminados com CLas são capazes de transmitir a bactéria para as fêmeas durante a cópula e que estas apresentam a capacidade de transmitir, em baixa titulação, CLas para a sua prole transovarianamente (HALL; SHATTERS; CARPENTER, 2010; MANN et al., 2012; PELZ-STELINSKI et al., 2010b).

Após a aquisição do patógeno em plantas infectadas ocorre o período de latência, que é o tempo necessário para que a *D. citri* seja capaz de inocular a bactéria em uma planta sadia, entretanto, os períodos de latência relatados são bastante contrastantes, variando de 24 horas (XU et al., 1988), 8 a 12 dias (GRAÇA, 1991), e até 21 dias (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1974; TABACHNICK, 2015). Autores demonstraram, por meio da técnica de PCR quantitativo, um aumento na concentração de CaLas em *D. citri* com o passar do tempo após a aquisição pelas ninfas, indicando que a transmissão é do tipo propagativa. A ocorrência de multiplicação da bactéria no vetor também é evidenciada pela longa persistência da transmissão. Adultos de *D. citri* permanecem infectivos com CaLas por até 12 semanas após a

aquisição em plantas infectadas, caracterizando transmissão persistente da bactéria (NASCIMENTO, 2010; ROBERTO et al., 2004).

Trabalhos de microscopia apontam que CLas encontra-se distribuída por diversos órgãos do inseto como hemolinfa, ovários, tecido muscular, tecido adiposo, intestino e glândulas salivares. Neste último, a colonização por CLas é menos frequente do que em outras partes do corpo do inseto. Entretanto, a glândula salivar apresentou maior titulação da bactéria, o que evidencia que a glândula salivar de *D. citri* constitui um fator limitante à transmissão de CLas (AMMAR et al., 2011; AMMAR; SHATTERS; HALL, 2011). Alguns estudos evidenciaram que CLas é capaz de ignorar as defesas da planta hospedeira por meio da modulação da produção de ácido salicílico (WANG; TRIVEDI, 2013). Diferenças na produção de compostos voláteis em plantas de laranja doce foram evidenciadas em resposta ao ataque de *D. citri* e à infecção por CLas. Esses eventos tornam a planta mais suscetível a patógenos e insetos devido a redução da liberação de diversos compostos com atividade antimicrobiana ou que são capazes de atrair inimigos naturais de insetos (HIJAZ; EL-SHESHENY; KILLINY, 2013), pois os compostos voláteis tornam as plantas infectadas mais atraentes ao inseto vetor do que plantas não infectadas. No entanto, devido às condições nutricionais da planta infectada, os psíldeos movem-se para plantas saudáveis após a picada de prova, o que auxilia a dispersão do patógeno (HIJAZ; EL-SHESHENY; KILLINY, 2013; HIJAZ; KILLINY, 2014; MANN et al., 2012).

Para o controle de *D. citri*, os citricultores têm à disposição um grande número de inseticidas, desde aqueles com ação de contato como aqueles com ação sistêmica, e com diferentes modos de ação, que devem ser utilizados para a redução populacional de *D. citri*, reduzindo dessa maneira a transmissão e disseminação das bactérias que causam HLB. Entretanto, o uso indiscriminado desses inseticidas pode levar aos efeitos colaterais indesejáveis, tais como surtos de pragas secundárias, e desenvolvimento de resistência de pragas, em caso de uso contínuo, o que levaria invariavelmente ao aumento do custo de produção (GRAFTON-CARDWELL; STELINSKI; STANSLY, 2013; QU, 2009; TIWARI et al., 2013; YAMAMOTO; ALVES; BELOTI, 2015; YAMAMOTO et al., 2009b).

Porém, um dos maiores desafios para os pesquisadores tem sido determinar métodos eficientes de controle de *D. citri* com baixo impacto ambiental que incluem, por exemplo, o controle biológico clássico, utilizando o ectoparasitóide *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) (PAIVA; PARRA, 2012; SKELLEY; HOY, 2004), os predadores naturais (MICHAUD; OLSEN, 2004), fungos entomopatogênicos (HOY; SINGH; ROGERS, 2010a) e, recentemente, o silenciamento gênico por meio da aplicação da técnica de

interferência por RNA (RNAi) (EL-SHESHENY et al., 2013; HAJERI et al., 2014; KILLINY et al., 2014).

#### **1.4. Silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi)**

RNAi é um fenômeno que promove o silenciamento pós-transcricional através de pequenos RNAs (*small interfering RNAs* - siRNAs). Este eficiente processo de regulação gênica baseia-se na introdução de duplas fitas de RNAs (dsRNAs) em células alvo, o que leva à ativação do mecanismo de RNAi e promove a degradação do mRNA homólogo, resultando em inibição ou redução da expressão de genes específicos (FIRE et al., 1998a; MEISTER G, 2004). A interferência por RNA é um mecanismo natural e evolutivamente conservado em eucariotos, tendo por principal função a proteção do genoma contra invasões virais e elementos transponíveis (ELBASHIR; LENDECKEL; TUSCHL, 2001).

Napoli, Lemieux e Jorgensen (1990) relataram pela primeira vez um evento relacionado ao silenciamento gênico ao utilizarem petúnias transgênicas com o objetivo de super-expressar o gene da enzima chalcona sintase (*chs*) envolvida na produção de antocianina. Porém, as linhagens transgênicas apresentaram flores com diferentes padrões de coloração ou totalmente brancas demonstrando que a super-expressão do transgene provavelmente levou à formação de dsRNA do gene *chs*, resultando no silenciamento do mesmo (ELBASHIR et al., 2001).

Em 1998, Fire e colaboradores revelaram que o mecanismo de silenciamento gênico era mediado por dsRNA. Neste trabalho, os pesquisadores utilizaram o nematóide *Caenorhabditis elegans* para manipular a expressão de um gene codificante para uma proteína miofilamentosa, e investigar como acontecia o silenciamento por RNAi. Para tanto, foram observados os efeitos fenotípicos em *C. elegans* após injeções com simples ou dupla fita de RNAs (RNA senso, RNA antisense e RNA dupla fita). As purificações contendo RNAs senso ou antisense apresentaram um efeito menos eficiente quando comparados ao dsRNA, o qual causou uma interferência potente e específica (FIRE et al., 1998a).

No processo do RNAi, dsRNA exógenos são clivadas pela enzima citoplasmática *Dicer*, uma endoribonuclease pertencente à família gênica das RNases III, gerando os *duplexes* de siRNAs de aproximadamente 21-23 nucleotídeos (Bernstein et al., 2001). Essas pequenas moléculas possuem um grupo fosfato nas extremidades 5' e dois nucleotídeos não pareados nas extremidades 3', o que define sua assinatura molecular (TOMARI; ZAMORE, 2005).

Os *duplexes* de siRNA são reconhecidos por uma proteína acoplada à *Dicer*, a R2D2, cuja função é analisar a estabilidade termodinâmica das extremidades das moléculas (TOMARI, 2004). A proteína R2D2 se liga ao oligo do *duplex* cuja extremidade 5' é mais estável, e uma proteína RNA helicase separa as duas fitas do siRNA (DALMAY et al., 2001). Hammond e colaboradores (2000) demonstraram que o oligo com extremidade 5' menos estável, chamado de fita funcional, é preferencialmente transferido para um complexo proteico denominado como complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), que efetivará o silenciamento gênico. Um componente essencial ao complexo RISC é a enzima RNase H, membro da família Argonauta, que busca no transcriptoma um RNA complementar à fita funcional associada a ele e, depois de identificado, o RNA alvo é clivado pelo RISC e degradado, promovendo o silenciamento gênico (HAMMOND et al., 2000; HUTVÁGNER; ZAMORE, 2002).

Uma outra via de silenciamento, relacionada ao silenciamento de genes endógenos, envolve uma classe de moléculas de RNAs pequenos (20-24nt), denominados micro RNAs (miRNAs), que desempenham um importante papel biológico no desenvolvimento de plantas e animais. miRNAs atuam em transcritos celulares alvo, induzindo sua clivagem ou supressão da tradução. Nessa via de silenciamento, RNAs não codificantes em forma de grampo, denominados pri-miRNA, são sintetizados pela RNA polimerase II, e em seguida processados por uma proteína tipo-DICER (DCL1). Pri-miRNAs sofrem uma clivagem inicial para a produção dos pre-miRNAs, que são exportados do núcleo para o citoplasma, onde são reconhecidos e clivados pela DICER, formando miRNAs maduros. Esses miRNAs são associados ao RISC e, de acordo com a complementariedade ao RNA alvo, resultarão em clivagem (complementariedade perfeita) ou supressão da tradução (complementariedade imperfeita) (CZECH; HANNON, 2011).

### **1.5. RNAi em insetos**

RNAi é uma ferramenta fundamental para explorar e desvendar a função de inúmeros genes em insetos, além do possível uso como estratégia de controle de insetos praga. Para a eficiente aplicação de RNAi, o inseto, ao internalizar o dsRNA através de alimentação, precisa absorver estes dsRNA 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, estudos em *C. elegans* e *Drosophila melanogaster* revelaram a existência de rotas envolvidas na absorção de dsRNAs,

uma rota através de proteínas transmembranas de canal, e outra rota envolvendo endocitose (BURAND; HUNTER, 2013; KATOCH et al., 2013; PRICE; GATEHOUSE, 2008).

Uma proteína transmembrana chamada de SID-1 localizada na superfície celular age como canais que permitem a entrada de dsRNAs nas células, em cooperação ou coordenação com a proteínas SID-2. A presença desta proteína foi confirmada no nematóide *C. elegans*, mas não em *D. melanogaster*, embora ortólogos de SID-1 tenham sido encontrados em diferentes ordens de insetos, incluindo Coleóptera, Díptera, Himenóptera, Lepidóptera e Hemiptera. Uma segunda rota para a absorção de dsRNAs foi descrita em *D. melanogaster* e envolve a absorção a partir de receptores que medeiam a endocitose (BANSAL; MICHEL, 2013; CHRISTIAENS; SMAGGHE, 2014; KATOCH et al., 2013; SCOTT et al., 2013). O entendimento dos mecanismos moleculares de como os dsRNAs são exportados para outros tecidos dentro do inseto, é de extrema importância para consolidar a tecnologia do RNAi para o controle de insetos.

Em 1998 Kennerdell e Carthew foram os primeiros a utilizarem RNAi *in vivo* para estudar os genes *frizzled* e *frizzled 2* em *D. melanogaster* (KENNERDELL; CARTHEW, 1998). Após um ano, estudos de RNAi demonstraram as funções dos genes *hox* em espécies de *holometabolous*, como no besouro *Tribolium castaneum* (BROWN et al., 1999). No ano seguinte, a RNAi foi usada pela primeira vez em espécies de *hemimetabolous*, como na espécie *Oncopeltus fasciatus* (BROWN et al., 1999; HUGHES; KAUFMAN, 2000).

Até hoje, estudos de RNAi tem sido realizados para investigar as funções gênicas em mais de 30 espécies de insetos incluindo uma grande variedade de ordens, como *Coleoptera* (BAUM et al., 2007), *Dictyoptera* (BELLÉS, 2010), *Diptera* (Walshe et al., 2008), *Hemiptera* (Shakesby et al., 2009), *Hymenoptera* (Nunes; Simões, 2009), *Isoptera* (Zhou et al., 2008), *Lepidoptera* (TURNER et al., 2006), *Neuroptera* (BELLÉS, 2010) e *Orthoptera* (MEYERING-VOS; MÜLLER, 2007). Além de possibilitar o estudo da função dos genes dos insetos, a abordagem de silenciamento gênico tem sido amplamente utilizada em diversos enfoques, incluindo a embriogênese, estágios de desenvolvimento, reprodução, biossíntese e comportamento (MITO et al., 2011)

O fornecimento da molécula de dsRNA em insetos pode ser efetuado através de alimentação, pulverização ou injeção mecânica intratorácica (TIMMONS; COURT; FIRE, 2001; ZHANG; LI; MIAO, 2013a). Injeção de dsRNA é amplamente utilizada e provou ser eficaz em muitas espécies de insetos, incluindo o afídeo (*Acyrtosiphon pisum*), abelhas (*Apis mellifera*), besouro de farinha (*T. castaneum*) e o gafanhoto (*Schistocerca americana*) (AMDAM et al., 2003; BUCHER; SCHOLTEN, 2002; DONG; FRIEDRICH, 2005;

JAUBERT-POSSAMAI et al., 2007) Porém, o método de injeção de dsRNA em insetos não é aplicável para controle pragas no campo, pois o organismo-alvo deve ser capaz de adquirir de forma autônoma dsRNA, sendo as melhores alternativas a alimentação e captação de dsRNA do lúmen do intestino para as células intestinais, e então disseminá-las para outros tecidos específicos (HUVENNE; SMAGGHE, 2010), ou também, a pulverização com dsRNAs que pode atravessar a parede externa do corpo do inseto e exercer seu papel de RNAi na cavidade interna do animal (ZHANG; LI; MIAO, 2013a).

### 1.6. Genes candidatos para estudos de RNAi em insetos

Além de estabelecer um método eficiente de fornecimento de moléculas de dsRNAs para insetos, é fundamental a escolha de genes candidatos a serem silenciados e que sejam relacionados a funções vitais e de desenvolvimento, podendo alterar o fenótipo ou causar mortalidade de insetos (RAO et al., 2015; SCOTT et al., 2013).

Dentre os genes alvos mais estudados, estão aqueles que codificam ATPases vacuolar (V-ATPases), que são complexos multienzimáticos altamente conservados, distribuídos entre diferentes organismos eucariontes, que funcionam como bombas de prótons dirigidas por ATP, participando da acidificação de organelas celulares. V-ATPases apresentam múltiplas subunidades, organizadas em dois complexos: V1 – localizado no citoplasma, o qual interage com ATP, ADP e Pi, e V0 - complexo integral de membrana, que medeia o transporte de H<sup>+</sup>. O complexo V1 é formado por 8 subunidades (A à H), apresentando a estequiometria *A3B3CDE2FG2H*, enquanto o complexo V0 é formado pelas subunidades *a,c,c',c'',de*, com estequiometria *ac4c'c''de*. O sítio catalítico para a hidrólise do ATP está presente na subunidade A do complexo V1 (JEFFERIES; CIPRIANO; FORGAC, 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 do transporte ativo secundário através destes epitélios (ALLAN et al., 2005).

O primeiro relato de RNAi na agricultura para controle de pragas foi demonstrado por via oral de moléculas de dsRNA expressas em plantas transgênicas (RNAi *in planta*) contra genes alvo de diversas pragas de importância econômica, incluindo o crisomelídeo do milho (*Diabrotica virgifera virgifera*) (BAUM et al., 2007). Neste trabalho, foi observado que após a infestação das plantas com *D. v. virgifera*, ocorreu a diminuição de danos presentes nas raízes de plantas milho transgênicas que produziam dsRNAs de V-ATPases (subunidades A, D e E). Além disso, após a obtenção de dsRNAs pelo inseto a partir do material vegetal via alimentação da planta, ocorreram reduções no acúmulo de RNAm dos genes alvos e, conseqüentemente, nas

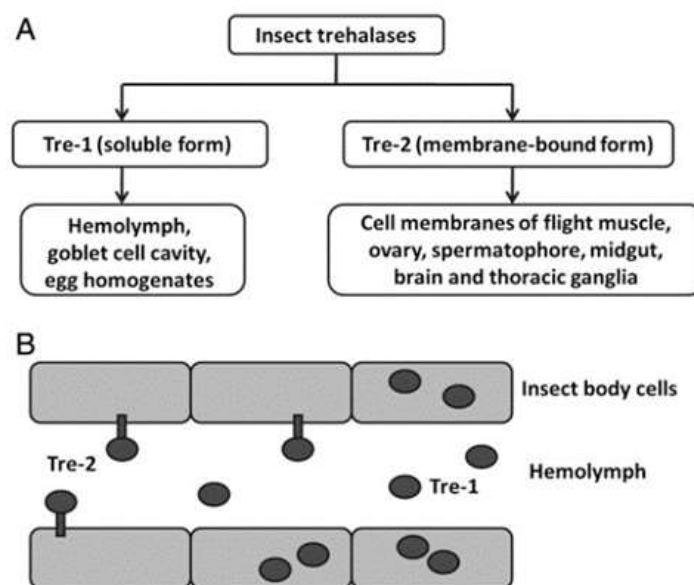
proteínas, levando a um retardo no desenvolvimento larval e aumento da mortalidade do inseto. A partir deste estudo, inúmeros relatos demonstraram o silenciamento de genes V-ATPases de insetos praga ocasionando altas taxas de mortalidade (KHAN et al., 2013; LI; ZHANG; ZHANG, 2011; MAO et al., 2015; UPADHYAY et al., 2011; WURIYANGHAN; ROSA; FALK, 2011).

No funcionamento ideal do metabolismo celular, o fluxo de nutrientes e metabólitos através das membranas celulares é facilitada por gradientes de íons que alteram o potencial de membrana celular e contribui para o potencial de membrana em repouso, servindo assim como uma força motriz para o transporte de partículas. Uma parte importante deste gradiente de íons é estabelecida por bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (GRINDSTAFF; BLANCO; MERCER, 1996). Essas bombas são dependentes de uma adenosina trifosfatase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase), cuja atividade enzimática utiliza a energia proveniente da degradação de ATP em ADP+Pi para transportar íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  contra os respectivos gradientes de concentração.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é uma proteína heterodímera consistindo de duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , presentes em proporções equimolares (KAPLAN, 2002). Recentemente, um estudo demonstrou, por meio de RNAi, o papel desta enzima na oogênese, desenvolvimento embrionário e regulação do hormônio juvenil em baratas (IRLES; SILVA-TORRES; PIULACHS, 2013).

ATP é a principal molécula de fornecimento de energia para as células em um organismo. ATP sintase produz 90% de todo o ATP requerido pelos organismos vivos processos e reações que consomem energia. A estrutura geral deste complexo enzimático é conservada de procariotos a eucariotos e consiste de um conjunto de dois complexos,  $F_0$  e  $F_1$  (CAPALDI; AGGELER, 2002). O primeiro está ligado à membrana mitocondrial e é composto por  $\text{ab}_2\text{c}$ , enquanto que o segundo é um complexo multiproteico solúvel em água e composto pelas subunidades  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  (BROWN et al., 2006). Em 2015, foi relatado o aumento no número de insetos praga de gramíneas mortos, *Locusta migratoria manilensi*, após redução da expressão do *ATP synthase-A mitochondrial-like* (HU; XIA, 2015).

Trealase é outra enzima bastante importante para insetos, pois é uma glicosidase que hidroliza trealose, o principal açúcar presente na hemolinfa de insetos, que tem um papel crucial como fonte de energia e é encontrada em bactérias, fungos, plantas e invertebrados (JORGE, POLIZELI, THEVELEIN, 1997). O tamanho da sequência das regiões codantes dos dois genes de trealase em insetos (*tre-1* e *tre-2*) é de aproximadamente 2 Kb e consistem em algumas regiões conservadas, sendo que a maioria deles possuem uma sequência sinal, dois domínios de trealase (Tre-1 e Tre-2) e uma região rica em glicina (BARRAZA; SÁNCHEZ, 2013). As funções biológicas desta enzima em insetos estão envolvidas com fornecimento de

energia, vôo, metamorfose, crescimento, reprodução, tolerância a estresse abiótico e síntese de quitina (SHUKLA et al., 2015). Existem duas formas de trealase distintas, Tre-1 na forma solúvel, enquanto Tre-2 na forma ligada à membrana celular (Figura 2) (SILVA et al., 2009). Tre-1 tem sido purificada a partir da hemolinfa, células intestinais e de homogenizados de ovos de alguns insetos. Por outro lado, Tre-2 tem sido encontrada em músculos das asas, células foliculares, células do ovário, intestino, cérebro e gânglios torácico. Devido a importância da trealase, a inibição desta enzima pode gerar consequências fatais para insetos. (CHEN et al., 2010a; 2010b; SHUKLA et al., 2015; ZHANG et al., 2012; ZHAO et al., 2016).



**Figura 2.** Formas da enzima trealase de insetos. A: Funções das formas Tre-1 e Tre-2 em insetos. B: Localização das formas Tre-1 e Tre-2 em insetos (SHUKLA et al., 2015).

Ambas as formas de trealase de insetos, Tre-1 e Tre-2, participam na ativação da via da síntese de quitina em insetos. Quitina é um polímero de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina e é o principal componente na formação da cutícula do exoesqueleto de insetos. A cascata da biossíntese de quitina utiliza a trealose como substrato inicial e o processo envolve oito enzimas, sendo que a primeira e a última são trealase e quitina sintase, respectivamente (MERZENDORFER; ZIMOCH, 2003). Embora o número de genes que codificam quitina sintase variem entre as espécies, em insetos existem apenas dois, *chitin synthase-A* (*CHS-A*) e *chitin synthase-B* (*CHS-B*) (ZHU et al., 2016). A CHS-A está localizada, principalmente, na cutícula do exoesqueleto dos insetos, enquanto que CHS-B é o principal componente da matrix peritrófica do canal alimentar (MERZENDORFER, 2006). Recentemente, diversos inseticidas



têm sido utilizados como inibidores de quitina sintase causando interferências no desenvolvimento e mudas, atribuídas a não formação de quitina, deposição endocuticular anormal, mudas abortivas, mortalidade e não eclosão de ovos (ZHU et al., 2016).

Em insetos, as laccases foram encontradas na cutícula, intestino médio, túbulos de Malpighi e glândulas salivares e tecidos. Foi demonstrado que em insetos, estas enzimas podem ter papéis fisiológicos em esclerotização da cutícula, desintoxicação de alimentos (especialmente compostos derivados de fenol), e manutenção da homeostase do ferro (COY et al., 2010). Estas enzimas são codificadas por dois genes *lac-1* e *lac-2*, sendo que o último codifica uma fenoloxidase que está envolvida no desenvolvimento de larvas, pupa e esclerotização e pigmentação da cutícula em *Tribolium castaneum* e *Monochamus alternatus* (ARAKANE et al., 2005; NIU et al., 2008). Alterações na produção desta enzima podem contribuir para distúrbios do desenvolvimento dos insetos, quer devido a esclerotização defeituosa da cutícula ou efeitos tóxicos dos metabólitos dos alimentos que não seriam neutralizados (ALVES et al., 2010; LUKASIEWICZ; WEGRZYN, 2015).

Estudos utilizando RNAi para silenciar genes *inhibitor of apoptosis* tem demonstrado o aumento da taxa de mortalidade e redução do ciclo de vida em insetos (PRIDGEON et al., 2008; PUGLISE; ESTEP; BECNEL, 2016; WALKER; ALLEN, 2011; YOKOI et al., 2013). A apoptose é um processo evolutivamente conservado de morte celular nos organismos, que é fundamental para o desenvolvimento e homeostase (VAUX; HAECKER; STRASSER, 1994). Os principais reguladores no processo de apoptose são as proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) e os genes que codificam as IAPs, *inhibitor of apoptosis*, foram identificados em insetos, leveduras e mamíferos, incluindo humanos, e participam de diversos processos celulares, incluindo a ubiquitinação, sinalização intracelular de MAP quinases, homeostase, morfogenese e divisão celular (SRINIVASULA; ASHWELL, 2008a).

Enzimas que atuam como reguladoras de reservas energéticas sobre condições de estresse por falta de nutrientes é de extrema importância em insetos. Por exemplo, arginina quinase, pertencente a uma família de proteínas conservadas com atividade fosfotransferase, catalisa a conversão entre fosfoarginina e ATP (NEWSHOLME; BEIS, 1978). Esta enzima existe apenas nos tecidos de invertebrados (células do epitélio do canal alimentar, fibras musculares e neurônios) e suas funções estão associadas com contração muscular, regeneração de ATP e transporte de energia no metabolismo celular (ELLINGTON, 2001; KUCHARSKI; MALESZKA, 1998). Pesquisas tem comprovado alterações no metabolismo, redução na

sobrevivência e desenvolvimento larval de insetos, quando há redução na expressão do gene que codifica a enzima arginina quinase (QI et al., 2015; ZHAO et al., 2008)

A reprodução é um dos processos fisiológicos mais importantes em insetos e os mecanismos moleculares envolvidos na reprodução são potenciais alvos para o controle de pragas (LU et al., 2015). Vitelogenina é a principal proteína presente em ovos de insetos e outras espécies ovíparas. A proteína é produzida no corpo gorduroso de insetos e transferidas da hemolinfa para os ovários (TUFAIL et al., 2014). A transferência de vitelogenina é realizada pela proteína receptora de vitelogenina, pertencentes à superfamília de receptor de lipoproteína de baixa densidade e, localizadas nas membranas de oócitos e tem a função de absorção de vitelogenina no desenvolvimento de oócitos de insetos (SHU et al., 2011). Pesquisas têm demonstrado que alterações na expressão do gene *vitellogenin receptor* ocasiona aumento nos níveis de vitelogenina na hemolinfa e diminuição nos ovários, além disso diminui o número de ovos depositados por *Bombyx mori*, *Bemisia tabaci*, *Spodoptera litura* e *Nilaparvata lugens* (LIN et al., 2013; LU et al., 2015; SHU et al., 2011; UPADHYAY et al., 2016).

Um dos principais objetivos no controle de inseto é o desenvolvimento de inseticidas que seja eficiente. Citocromo P450 (CYP ou CYP450) é uma superfamília ampla e diversificada de proteínas envolvidas no metabolismo de compostos xenobióticos em insetos. Este grupo de proteínas está associada com a resistência aos inseticidas e metabolismo de uma vasta gama compostos endógenos e exógenos que inclui hormônios, feromônios, inseticidas e compostos secundários de plantas em insetos (FEYEREISEN, 2006). Assim, estratégias que visam reduzir a expressão de genes que codificam proteínas da família CYP450, por exemplo RNAi, tem sido bastante utilizada em insetos pragas (KILLINY et al., 2014; MAO et al., 2013, 2007, 2011; WAN et al., 2014). Por exemplo, o gene *CYP6BG1* é altamente expresso em *Plutella xylostella* resistentes a permetrina, e observaram que o gene foi silenciado após a ingestão de uma gotícula de solução de dsRNA do gene alvo e os insetos tornaram-se mais sensíveis ao inseticida piretroide (BAUTISTA et al., 2009). Em outro estudo, foi fornecido moléculas de dsRNAs do gene *CYP6CM1*, via ingestão, para moscas branca e observaram que a redução da expressão do gene inibiu a habilidade de resistência ao pesticida imidacloprid ocasionando aumento na taxa de mortalidade dos insetos (LI et al., 2014).

O processo digestivo em insetos é realizado por serino-proteases como tripsina, quimiotripsina e elastase presentes no pH alcalino do intestino médio (SRINIVASAN; GIRI; GUPTA, 2006). Entretanto, os processos de desenvolvimento, metamorfose e eclosão são realizadas por enzimas com afinidade por pH ácido, como as catepsinas, que são tipicamente armazenadas nos lisossomos (TURK; TURK; TURK, 2000). Com base na diversidade de

sequências e de funções, as catepsinas são classificadas em diferentes tipos. As catepsinas A e G são serino-proteases; D e E são agrupados como aspártico-proteases, enquanto que B, C, F, H, K, L, O, S, V, são cisteíno-proteases (SAIKHEDKAR et al., 2015). Catepsinas estão associadas com a remodelação de tecidos durante o desenvolvimento de insetos, isto sugere o seu papel na apoptose e autofagia. Por exemplo, foi observado que durante a metamorfose, o processo de apoptose das células do corpo gorduroso de *Helicoverpa armigera*, *Manduca sexta* e *Bombyx mori* foi dependente da expressão dos genes catepsina-L, catepsina-B e catepsina-D, respectivamente (FACEY; LOCKSHIN, 2010; GUI et al., 2006; WANG et al., 2008). Portanto, a supressão de atividades das catepsinas por meio da técnica de RNAi pode ser um método promissor para o controle de insetos praga (CHU et al., 2014; DA SILVA FERRARA et al., 2015; LIU et al., 2010; SAPOUNTZIS et al., 2014). Assim como foi observado aumento na taxa de mortalidade de *H. armigera* nos estágios pré-pupa e deformidades nas pupas destes insetos (CHIKATE et al., 2016). Da mesma forma, em *B. mori*, a inibição da transição larva-pupa foi constatada ao silenciar o gene *cathepsin-B* (WANG et al., 2008); e atraso ou anormalidades no estágio de pupa quando a expressão do gene *cathepsin-D* foi reduzida (GUI et al., 2006).

Ainda na tentativa de controlar insetos praga, já foi relatado a utilização de plantas transgênicas de arroz que produziam dsRNAs do gene *carboxypeptidase* e constataram que quando as ninfas de 3º instar de *Nilaparvata lugens* se alimentaram das plantas transgênicas ocorria a redução na expressão deste gene no mesêntero do inseto, porém não houve redução significativa na taxa de mortalidade do inseto (ZHA et al., 2011). As carboxipeptidases são exopeptidases que removem um único aminoácido da porção C terminal de proteínas ou substratos peptídicos. Assim, desempenham um papel importante na digestão de proteínas no intestino de insetos, atuando para libertar os aminoácidos livres dos peptídeos produzidos pela ação de endopeptidase, completando assim o processo digestivo e a geração de moléculas que podem ser absorvidos pelo intestino, através de transportadores de aminoácidos (BOWN; GATEHOUSE, 2004; SIDYELYEVA; BAKER; FRICKER, 2006).

Desde as descrições iniciais de silenciamento gênico em petúnias transgênicas (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990) e *C. elegans* (ANDREW; CRAIG, 2006; FIRE et al., 1998a), o processo de RNAi mediado por dsRNA induzindo o silenciamento específico de genes alvo, tem se tornado o método mais importante para modular a expressão e estudar as funções dos genes conhecidos por meio da sequência de DNA. Na biotecnologia, a RNAi tem grande potencial devido à sua alta especificidade e pode, portanto, servir como um novo método

específico para o controle de pragas e/ou insetos vetores na agricultura (BURAND; HUNTER, 2013; HUVENNE; SMAGGHE, 2010; ZHANG; LI; MIAO, 2013a).

## **2. HIPÓTESE**

O silenciamento de genes alvos pode acarretar em um aumento da taxa de mortalidade na população do inseto vetor *D. citri* e, como consequência, diminuir a transmissão de CLam e CLas, e ser um método eficiente no manejo do HLB nos pomares de citros.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Geral**

O objetivo geral deste projeto foi analisar a regulação da expressão gênica do inseto vetor de HLB, *Diaphorina citri*, em resposta a interferência por RNA (RNAi).

### **3.2. Específicos**

- Estabelecer criação de *D. citri* no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas/SP.
- Estabelecer sistema de dieta artificial para *D. citri* utilizando diferentes concentrações de sacarose.
- Obtenção de sequências de genes candidatos, a partir de sequências do transcriptoma de *D. citri* depositadas no banco de dados Psyllid.org para desenho de *primers* específicos e amplificação dos genes candidatos.
- Construção dos *primers* específicos para *D. citri* contendo sequência do promotor T7 para produção dos dsRNAs via transcrição *in vitro*.
- Avaliar a mortalidade de *D. citri*, após ingestão de dsRNAs via dieta artificial e planta ao longo do tempo.
- Avaliar a expressão temporal e quantitativa de genes alvos de *D. citri*, após ingestão de dieta artificial *in vitro* em diferentes concentrações de dsRNAs.

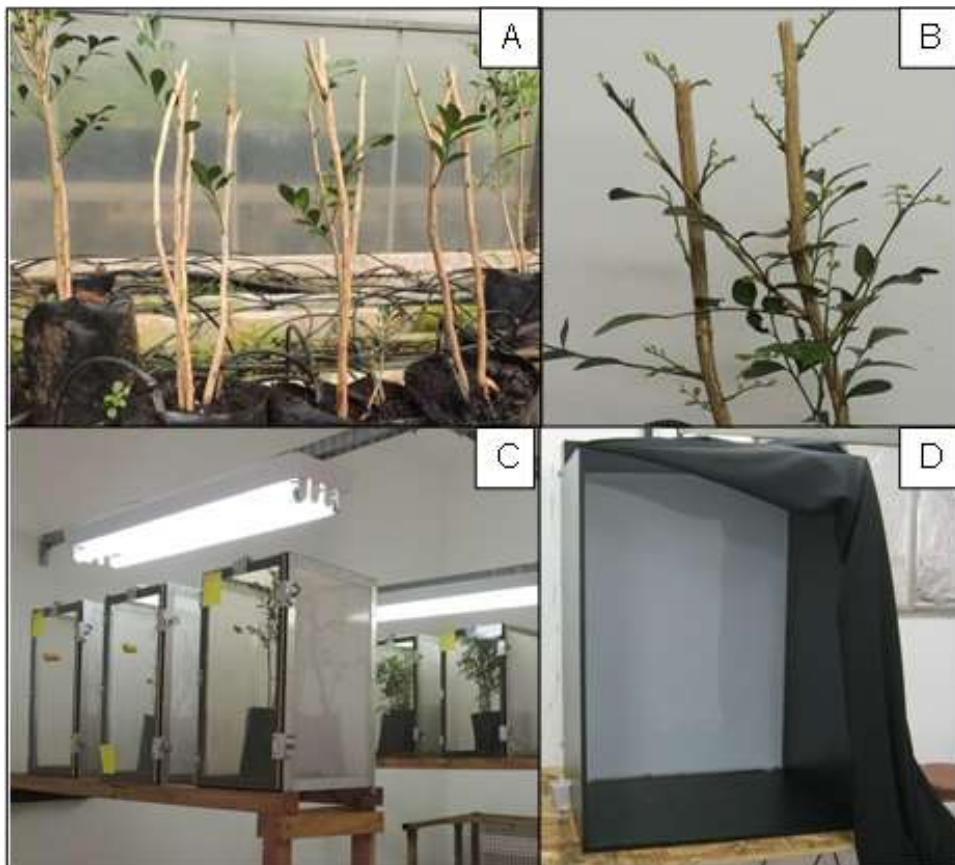
## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Criação e manutenção dos insetos**

Uma colônia de *D. citri* foi cedida pelo Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos do LEA/ESALQ e os insetos utilizados nos experimentos foram criados no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’ (CCSM),

Cordeirópolis-SP, do Instituto Agronômico de Campinas. A criação de insetos foi mantida em gaiolas com revestimento de tela antiafídica e porta de acrílico transparente (35 x 35 x 50 cm), contendo três mudas de *Murraya* spp (L.) Jack (Rutacea) de 30 cm de altura com brotações novas. As gaiolas foram mantidas em sala com temperatura controlada, a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 14h, umidade relativa do ar de  $70 \pm 10\%$  e sob lâmpadas fluorescentes (40W). Para a postura de ovos foram colocados 180 insetos adultos por gaiola com idade de uma a três semanas (Fig. 3). Após sete a oito dias de oviposição, os adultos foram retirados para que se pudesse acompanhar a eclosão dos ovos e desenvolvimentos das ninfas até a emergência dos adultos.

Também foi estabelecida uma população de *D. citri* em plantas de *Citrus macrophylla*, dentro de gaiolas plásticas, no Centro de Pesquisa do Departamento de Fitopatologia da Universidade da Califórnia (UCDavis), Davis, coordenado pelo Prof. Dr. Bryce Falk. As gaiolas foram mantidas a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 14h e umidade relativa do ar de 60-70%.



**Figura 3.** Condições para criação de *D. citri* no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura. A) Mudanças de murta (*Murraya* spp) podadas para surgimento de brotações novas;

B) Mudas de murta com brotações novas; C) Gaiolas contendo três murtas sob condições controladas. D) Câmara de transferência de insetos.

#### **4.2. Dieta artificial para *D. citri* em sistema de alimentação *in vitro***

Foram realizados ensaios para avaliar o período de sobrevivência de adultos e ninfas de 3º instar de *D. citri* no sistema de alimentação *in vitro* com diferentes concentrações de sacarose. As avaliações dos ensaios foram realizadas a cada 24h durante cinco dias, totalizando 120h.

Para avaliar a sobrevivência de *D. citri* adultas da população estabelecida no Centro de Citricultura neste sistema de dieta alimentação *in vitro*, primeiramente, foram preparados cinco tratamentos compostos por água deionizada autoclavada, sacarose (0, 10, 20, 30 e 40%) e corantes alimentícios (0,1% de corante verde e 0,4% de corante amarelo - ARCOLOR® ou McCormick®) com pH ajustado para 7,4 e posteriormente autoclavadas. Ainda para avaliar a sobrevivência dos adultos desta população de insetos, um segundo ensaio foi realizado com concentrações 0, 20, 25 e 30% de sacarose. E por último, um ensaio avaliando as concentrações de 15 e 30% de sacarose no sistema de alimentação *in vitro* para as populações de *D. citri* estabelecidas no Centro de Citricultura e UC Davis.

Na montagem dos ensaios com *D. citri* adultas, com até sete dias após a emergência, foram imobilizadas à 4°C e colocados cinco insetos nas gaiolas de alimentação, constituídas por um tubo de poliestireno vazado (9 cm de altura e 3 cm de diâmetro) com tampa de plástico em uma das extremidades. O tubo foi coberto com uma primeira membrana de Parafilm® (5 x 5 cm) e esticada até oito vezes o seu tamanho original, então 100 µL de cada dieta foram depositados sobre esta membrana e uma segunda membrana foi colocada sobre cada dieta formando um sachê. Todo o ensaio foi conduzido em câmara BOD a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 10\%$  UR e fotoperíodo de 14h.

Como indicativo de penetração estiletar e atividade alimentar dos insetos nas dietas artificiais, foi quantificado o número de bainhas salivares na membrana de Parafilm®. Após o período de alimentação dos insetos, a membrana superior e a dieta foram removidas do sistema, e a membrana inferior (contendo as bainhas salivares) foi corada em contato com o corante safranina 0,1% por 15min. Após o tratamento, as bainhas puderam ser observadas e quantificadas sob microscópio óptico (100x). Foi avaliada a média da  $\sum$  do número de bainhas salivares contidas em duas áreas de 5 x 5 mm na membrana de Parafilm®.

Um ensaio semelhante foi realizado com ninfas de 3º instar, utilizando-se cinco gaiolas com dez indivíduos. Os tratamentos consistiram de sacarose 0 e 30%, ambas com corantes alimentícios. As ninfas foram colocadas sobre a primeira membrana de Parafilm® já estendida e semi-fixada nos tubos plásticos utilizados nos bioensaios para adultos. Após a transferência das ninfas, a membrana foi fixada no tubo plástico com a face contendo os indivíduos para o interior da gaiola. Após esta etapa, 100 µL das dietas foram colocadas sobre a primeira membrana e uma segunda foi colocada sobre cada dieta. As condições deste ensaio foram as mesmas do ensaio com os insetos adultos.

#### **4.3. Extração RNA total de *D. citri***

A extração de RNA total foi realizada de acordo com o protocolo do reagente *TRIzol*® (Life Technologies, Grand Island, New York). Foram utilizados 10 insetos adultos por microtubo e macerados em nitrogênio líquido. Todas as etapas foram conduzidas a 4°C e em condições livre de RNases. As amostras de RNA total foram eluídas em água DEPC, tratadas com *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) e quantificadas a 260nm em aparelho Nanodrop ND-8000 (*Thermo Scientific*). A integridade do RNA foi observada em gel de agarose 0,8% (p/v) contendo brometo de etídio (1%), em tampão TAE pH 8,3. Para a síntese de cDNA foi utilizado 1,0 µg de RNA total, para volume final de 20µL, seguindo recomendações do protocolo do kit *RevertAid* (*Promega*).

#### **4.4. Obtenção das sequências dos genes alvos e projeção de *primers* específicos**

A partir das sequências do transcriptoma do estágio de ninfa de *D. citri* disponíveis no banco de dados Psyllid.org (<http://www.psyllid.org/node/1>) foi realizada uma anotação baseada em sequências de aminoácidos de insetos depositadas no banco de dados do NCBI (*Acyrtopsiphon pisum*, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Apis florea*, *Apis mellifera*, *Bombus impatiens*, *Bombus terrestris*, *Drosophila melanogaster* e *Drosophila pseudoobscura*), utilizando a ferramenta BlastX.

A partir desta anotação, foi feita uma busca de 16 genes candidatos no transcriptoma de *D. citri* com a finalidade de desenhar *primers* para PCR convencional, construção de dsRNA e PCR em tempo real específicos para estas sequências. Para cada um dos genes alvos com baixa similaridade no alinhamento com o transcriptoma e, conseqüentemente, não anotado, foi feito um alinhamento BlastX utilizando sequências de proteínas de organismos eucariotos obtidos no Genbank-NCBI, utilizando as sequências do genoma de *D. citri* que foram

disponibilizadas no site do projeto em 19/03/2010 (<http://www.psyllid.org/node/1>). Para cada um destes genes, foi criado um arquivo contendo as sequências específicas para cada proteína alvo presente em insetos que estavam disponíveis no Genbank-NCBI e este foi formatado como o banco de dados para busca. Os *scaffolds* do genoma de *D. citri* foram as sequências de entrada da busca (*query*) a fim de selecionar e identificar os *scaffolds* com maior similaridade com o banco de proteínas.

A partir das identidades dos *scaffolds*, foi feita uma busca destes no genoma de *D. citri* e seus conteúdos, ou seja, as sequências de nucleotídeos contidas em cada um, foram analisados na ferramenta GeneMark.hmm (<http://opal.biology.gatech.edu/eukhmm.cgi>), a fim de prever a localização de prováveis proteínas dentro do *scaffold*. Foi realizado um BlastP no banco do Genbank-NCBI para se confirmar a identidade da proteína. A ferramenta GeneMark.hmm disponibiliza para o usuário não somente a sequência de aminoácidos da provável proteína, como também a posição de íntrons e exons que a compõe dentro do *scaffolds*. Com estas coordenadas, foi possível localizar a sequência de nucleotídeos de cada gene dentro do *scaffold*, selecioná-las, retirar os íntrons, e assim ficar somente com a sequência codante do gene.

Assim, a partir da anotação das sequências do transcriptoma e genoma de *D. citri* foram selecionados 16 genes candidatos para avaliação nos experimentos de RNAi: *arginine kinase*, *ATP synthase subunit-D like mitochondrial*, *V-ATP synthase subunit-E*, *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase-A*, *cathepsin B*, *cathepsin D*, *cathepsin L*, *carboxypeptidase D*, *carboxypeptidase E*, *carboxypeptidase M*, *chitin synthase*, *cytochrome P450 monooxygenase (CYP4C68)*, *inhibitor of apoptosis*, *laccase 2*, *trehalase* e *vitellogenin receptor*. Estes genes candidatos foram escolhidos por apresentarem importância na fisiologia, metabolismo e desenvolvimento de inseto.

Em seguida, foi possível desenhar *primers* específicos (Tabela 1) para PCR convencional para amplificação dos genes candidatos e posterior construção de dsRNA. O desenho de *primers* para a síntese de dsRNA foi realizada utilizando a ferramenta CLC Genomics Workbench 4, com *amplicons* maiores que 250 pb, temperatura de anelamento de 55 °C ± 5 °C, e avaliando suas penalidades quanto a formação de dímeros. Também foi utilizado o programa específico do pacote BLAST do NCBI, denominado *Search for short, nearly exact matches* para analisar a similaridade entre a sequência dos amplicons de cada gene escolhido e transcritos no organismo alvo, assim eliminando o pareamento entre sequências dos genes alvos e organismos não alvo.



**Tabela 1. Primers utilizados para amplificação dos genes alvo.**

<i>Primer</i> <sup>1</sup>	Sequência (5'-3')	<i>Amplicon</i> (pb)	<i>Tm</i> (°C)
IA_fwd	TTCGGTATCCTCGCAGATG	645	54,5
IA_rvs	AGCTCTGCATGGTGTGTTGATG		55,9
ATA_fwd	GCGTCAAAGGCTTCAGATG	628	54,2
ATA_rvs	CGACTACGTCACCCAATACG		55,1
ATD_fwd	GGCTGCTAGACGTTTTACTGG	507	55,7
ATD_rvs	TCCCACCATTCTTCATCTTCCT		55,7
CD_fwd	AAACAGACCTGGGAAACGCT	390	57,0
CD_rvs	GCATCTTGTCCAAGTTGTGCGC		56,9
CL_fwd	GCAGTGGCAGCTGTTTCAT	623	56,4
CL_rvs	TTGTAGCGGCAATTGTCATC		53,5
CS_fwd	AACTTTGGTCGAGACAAGCAG	500	55,4
CS_rvs	TCCCAATAACCGCAGGAC		54,7
TR_fwd	CACACACCCGATACAACATGG	419	56,0
TR_rvs	AAATTCCCAGCATGCCTTTC		56,3
CAD_fwd	CTACCGAATTGGACGCTTTC	542	59,7
CAD_rvs	ATAACTAGCAACTACGGCACCAC		59,6
LAC_fwd	AGAGGCAACGCTGAACTGTC	534	60,6
LAC_rvs	GTCGTACAGGTGGGAGTTCG		60,6
ATPase-E_fwd	TTAAGCGATGCGGATGTT	251	57,8
ATPase-E_rvs	TCTTTAGAGCCTTGAGACGTG		57,8
CAM_fwd	AATACAGCGCCGTCAGGTT	574	59,8
CAM_rvs	AGTAGGTGAGGGCCAAATGTT		59,9
CAE_fwd	GGAAGTGCTCTCCATTCTGG	549	59,8
CAE_rvs	ACCAGATCGCCTGAATGAAG		60,2
VR_fwd	GAAGTTTGTGGAACCTCAGCAT	776	60,5
VR_rvs	ACAGCTTTGCAAGACGTGTG		60,5
CYP_fwd	TAGCCTGGACCCTCTTCCTT	332	60,2
CYP_rvs	TCTCAGGTAGGAAGTTGTCAGGT		59,3
AK_fwd	ATGGCATTCTTGTATGGCGTA	625	60,4
AK_rvs	GCTTCTGTTGCACCTCCTTAGT		60,0
CB_fwd	CTGCTACAACCCGTCCTATG	370	58,3
CB_rvs	TTGCAAAAACCTGTGGGTAGC		58,8

<sup>1</sup>Sigla dos *primers* utilizados para amplificação dos genes específicos de *D. citri*. AK: Arginine kinase; ATD: ATP synthase subunit-D like mitochondrial; ATPase-E: V-ATP synthase subunit-E; ATA: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase-A; CB: Cathepsin B; CD: Cathepsin D; CL: Cathepsin L, CAD: Carboxypeptidase D; CAE: Carboxypeptidase E; CAM: Carboxypeptidase M; CS: Chitin synthase; CYP: Cytochrome P450 monooxygenase (CYP4C68); IA: Inhibitor of apoptosis; LAC: Laccase 2; TR: Trehalase; VR: Vitellogenin receptor. Fwd: primer forward; rvs: primer reverse.

#### 4.5. Amplificação e sequenciamento de genes alvos

Para a reação de amplificação dos genes alvos de *D. citri* foram utilizados 12,5 µL de *GoTaq<sup>®</sup> Colorless Master Mix (Promega)*, 1 µL de *primer forward (F)* (10 µM), 1 µL de *primer reverse (R)* (10 µM), 4 µL da solução com cDNA para volume final de 25 µL. O ciclo utilizado foi primeiramente uma etapa de desnaturação a 94 °C por 3 min seguidos de 35 ciclos constituídos por: 94 °C por 1 min; 50 a 60°C por 45 s para anelamento dos *primers*, dependendo do gene em estudo, 72 °C por 1 min temperatura de extensão a 72 °C por 10 min. Após amplificação, os produtos foram analisados em gel de agarose 1%, em tampão TBE (1X), contendo 1 % de brometo de etídeo, e visualizado sob luz ultravioleta. Após amplificação dos genes alvos, 12 µL do produto de PCR foram purificados com 3 µL de ExoSap-IT (*GE Healthcare*), incubados a 37 °C por 15 min e aquecidos a 80 °C por 15 min. Em seguida, os produtos foram sequenciados para confirmação das sequências, utilizando kit *BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing (LifeTech)*.

#### 4.6. Síntese de dsRNAs

Primeiramente foi realizada a reação de amplificação dos genes alvos utilizando *GoTaq<sup>®</sup> Colorless Flexi Buffer 5X (Promega)*; 2,5 µL  $MgCl_2$  (25mM); 0,5 µL dNTPs (10mM); 1,25 µL *forward primer* com o promotor T7 (10µM); 1,25 µL *reverse primer* com o promotor T7 (10 µM); 0,125 µL *GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase* (5 U/µL); 1,0 µL de cDNA e água livre de nucleotídeos para um volume final de 25 µL. O ciclo utilizado foi primeiramente uma etapa de desnaturação a 95 °C por 2 min seguidos de 35 ciclos constituídos por: 95 °C por 30 s; 60 °C por 45 s para anelamento dos *primers*, 72 °C por 1 min temperatura de extensão a 72 °C por 10 min. Após amplificação, os produtos foram analisados em gel de agarose 1%, em tampão TBE (1X), contendo 1% de brometo de etídeo, e visualizado sob luz ultravioleta. Os produtos de PCR foram purificados de acordo com o protocolo do kit *QIAquick PCR Purification (Quiagen<sup>®</sup>)*.

As fitas de dsRNAs foram sintetizadas a partir da transcrição *in vitro* dos produtos de PCR de cada gene alvo utilizando o kit *MEGAscript<sup>®</sup> T7 RNAi (Ambion)*. Como tratamento controle, um fragmento de 325 pb do GFP (Green Fluorescent Protein) também foi sintetizado como dsRNA. Em ambos os pares de *primers* (Tabela 1), foi adicionada a sequência do promotor da enzima T7 RNA polimerase (TAATACGACTCACTATAGGGAGA), no sentido 5'. A adição da sequência do promotor da enzima T7 RNA polimerase, no sentido senso e antisenso dos *primers*, geram produtos de PCR com sítios de ligação para T7 RNA polimerase, enzima presente nos kits para a síntese de dsRNA através de transcrição *in vitro*.

A transcrição *in vitro* de dsRNAs foi realizada a temperatura ambiente com 1 µg de DNA linear template purificado, 2 µL de tampão T7 Reaction (10X), 2 µL de cada nucleotídeo (ATP, GTP, CTP, UTP) e 2 µL da enzima da reação, para volume final de 20 µL. A solução foi incubada a 37 °C overnight e após a reação de transcrição *in vitro*, as amostras foram tratadas com 1 µL de TURBO DNase e incubadas a 37 °C por 15 min. Após a formação dos dsRNA, as amostras foram purificadas com 30 µL cloreto de lítio (*Ambion*) e 30 µL de água livre de nucleotídeos. As amostras foram incubadas por 1 h a -20 °C e centrifugadas a 16.000 g por 15 min a 4 °C. Após remover a fase líquida da amostra, o pellet foi lavado com 1 mL de etanol 70 % e foi realizada nova centrifugação. O etanol da amostra foi removido e os dsRNAs eluídos em água livre de nucleotídeo. Em seguida, foi feita a quantificação dos dsRNA em aparelho Nanodrop (GE *Healthcare*) e analisados em gel de agarose 1 %, em tampão TBE (1X), contendo 1 % de brometo de etídeo, e visualizado sob luz ultravioleta.

#### **4.7. Bioensaio de RNAi em sistema de alimentação para *D. citri***

Os ensaios foram realizados utilizando psilídeos adultos jovens se alimentando de dieta artificial constituída por 15 % de sacarose, corantes alimentícios (McCormick & CO) (0,1 % verde e 0,4 % amarelo) e diferentes concentrações de dsRNAs (200, 500, 1000 ng.µL<sup>-1</sup>) de cada gene alvo. Uma alíquota da solução (100 µL) foi depositada na membrana de Parafilm® e uma segunda membrana do mesmo material foi esticada no topo de um frasco plástico transparente (25 mm X 45 mm) de modo a formar um sachê para garantir que a dieta líquida fosse distribuída uniformemente. Os ensaios de alimentação foram realizados à temperatura ambiente e sob fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro, 60-70% de umidade relativa. Os frascos de plástico foram colocados 1,2 m a partir da fonte de luz. Cada tratamento foi constituído por 30 indivíduos em 3 frascos de plástico (10 indivíduos em cada frasco) (Fig. 4). As avaliações da mortalidade dos insetos foram realizadas durante cinco dias. DsRNA de GFP (325 pb) foi utilizado como controle negativo. Os ensaios foram repetidos três vezes.



**Figura 4.** *D. citri* adultos em sistema de alimentação *in vitro*.

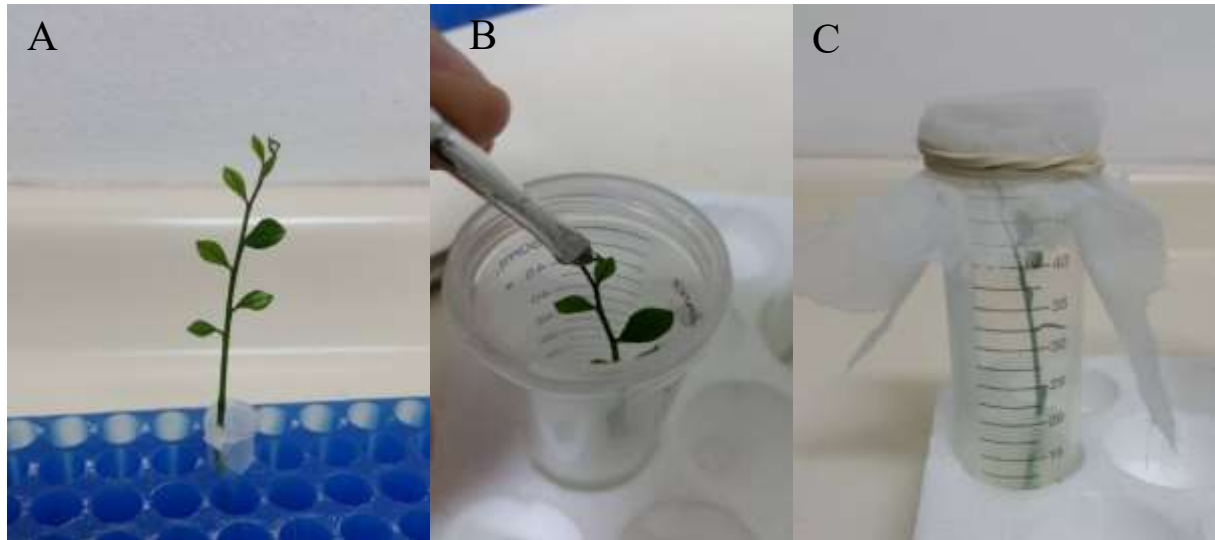
#### **4.8. Estabilidade de dsRNAs em solução de dieta artificial**

Para testar a estabilidade de dsRNAs de cada gene alvo e de GFP em solução de dieta artificial, foram coletados 50  $\mu\text{L}$  de cada solução após o último dia de avaliação do ensaio de alimentação descrita anteriormente. As soluções de dieta artificial foram diluídas em água destilada (1/100) e os dsRNAs foram aplicados em gel de agarose 1 %, em tampão TBE (1X), contendo 1 % de brometo de etídeo, e visualizado sob luz ultravioleta.

#### **4.9. Desenvolvimento de método de silenciamento de genes por alimentação de dsRNAs via planta**

Um novo método foi desenvolvido para silenciar genes por meio de alimentação de dsRNAs em ramos de *Murraya spp.* Primeiramente, foi realizada poda de ramos da planta e transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo água destilada (Fig. 5A). Após 24 h, cada microtubo contendo ramo de murta foi colocado dentro de tubo Falcon (50 mL) e uma fêmea previamente copulada foi depositada em uma folha do ramo (Fig. 5B). Os tubos foram cobertos com tela anti-afídeo e mantidos por 24 h de luz, UR 80% e  $25 \pm 1$  °C. Após este período, as fêmeas presentes em cada tubo foram retiradas e os ovos nos ramos da planta foram contabilizados. Ao final da contagem de ovos, os ramos foram colocados em solução de dsRNAs em microtubo de 1,5mL e mantidos em tubo Falcon cobertos com tela anti-afídeo (Fig. 5C). Os tratamentos consistiram de soluções de dsRNAs de *inhibitor of apoptosis*, *cathepsin D*, *chitin synthase* e GFP na concentração  $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  e água destilada. Foram utilizadas cinco

repetições biológicas em cada tratamento e, após a eclosão dos ovos nos ramos, foram realizadas avaliações de mortalidade a cada dois dias durante 11 dias. Os tubos foram mantidos por 12 h de luz, UR 80% e  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .



**Figura 5.** Sistema de fornecimento de dsRNAs em ramo de *Murraya spp.* A: Ramo mantido por um dia em água destilada. B: Deposição de uma fêmea copulada no ramo. C: Ramo em solução de dsRNA em microtubo de 1,5 mL e mantido dentro de tubo Falcon coberto com tela anti-afídeo.

#### 4.10. Detecção da estabilidade de dsRNAs nos tubos e nas folhas *Murraya spp*

Para testar a estabilidade dos dsRNAs nos tubos contendo ramos de murta, após cinco dias na solução de dsRNA foram coletados 10  $\mu\text{L}$  das soluções de dsRNAs de GFP, *inhibitor of apoptosis*, *cathepsin D* e *chitin synthase*. Para detectar as moléculas de dsRNAs GFP, *inhibitor of apoptosis*, *cathepsin D* e *chitin synthase* nos ramos foram coletados 0,10 g de tecido vegetal e triturados em nitrogênio líquido. A extração de RNA total das plantas foi realizada de acordo com o protocolo do reagente *TRIzol*® (Life Technologies, Grand Island, New York). Os microtubos contendo *primers* necessários para sintetizar dsRNAs de GFP, *inhibitor of apoptosis*, *cathepsin D* e *chitin synthase* foram aquecidos juntamente com as amostras de RNA a  $65^\circ\text{C}$  por 5 minutos e colocados no gelo. Após esta etapa foi realizada a transcrição reversa e o cDNA foi utilizado PCR nas mesmas condições descritas no item 4.5 para os genes GFP, *inhibitor of apoptosis*, *cathepsin D* e *chitin synthase*. Os amplicons de dsRNAs foram aplicados em gel de agarose 1 %, em tampão TBE (1X), contendo 1 % de brometo de etídeo, e visualizado sob luz ultravioleta.

#### 4.11. Análise quantitativa da expressão de genes de *D. citri* após ingestão de dsRNAs

Ao término dos ensaios descritos nos itens 4.7 e 4.9, o RNA total foi extraído de um *pool* de três insetos vivos de cada tratamento utilizando o kit *ZR Tissue and Insect Microprep*<sup>®</sup> (Zymo Research<sup>®</sup>) e o DNA foi removido das amostras por *DNase I Set* (Zymo Research<sup>®</sup>) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total das amostras foi dissolvido em 10 $\mu$ L de água DEPC e quantificadas a 260 nm em aparelho Nanodrop ND-8000 (*Thermo Scientific*). O cDNA foi sintetizado a partir de 500 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> de RNA, 4  $\mu$ L *iScript*<sup>®</sup> *Reverse Transcription Supermix* (Bio-Rad<sup>®</sup>) e água livre de nucleotídeos para um volume final de 20  $\mu$ L. As amostras foram incubadas por 5 min a 25°C, seguidas por 30 min a 42 °C e 5 min a 85 °C.

Para evitar possíveis artefatos resultantes de dsRNAs presentes no tecido de *D. citri*, *primers* e sondas para qRT-PCR foram desenhados para detectar mRNAs dos genes alvos fora da região do fragmento de dsRNAs utilizados para os experimentos de alimentação artificial (Tabela 2). Esta medida foi tomada para evitar que os *primers* de qRT-PCR se anelassem ao dsRNA absorvido pelos insetos durante o período de alimentação, o que poderia interferir nos resultados de expressão gênica. O desenho de *primers* e sondas foram realizados na ferramenta *RealTime qPCR Assay* (<https://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>). Para validar estes *primers* foram utilizados 5  $\mu$ L de *GoTaq*<sup>®</sup> *Colorless Flexi Buffer 5X* (Promega); 2,5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 0,5  $\mu$ L dNTPs (10 mM); 1,25  $\mu$ L *forward primer* (F) (10  $\mu$ M); 1,25  $\mu$ L *reverse primer* (R) (10  $\mu$ M); 0,125  $\mu$ L *GoTaq*<sup>®</sup> *DNA Polymerase* (5 U/ $\mu$ L); 1,0  $\mu$ L de cDNA e água livre de nucleotídeos para um volume final de 25  $\mu$ L. O ciclo utilizado foi primeiramente uma etapa de desnaturação a 95 °C por 2 min seguidos de 35 ciclos constituídos por: 95 °C por 30 s; 60 °C por 45 s para anelamento dos *primers*, 72 °C por 1 min temperatura de extensão a 72 °C por 10 min. Após amplificação, os produtos foram analisados em gel de agarose 1 %, em tampão TBE (1X), contendo 1 % de brometo de etídeo, e visualizado sob luz ultravioleta.

**Tabela 2. Primers e sondas utilizados para as qRT-PCR.**

<i>Primer</i> <sup>1</sup>	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Tm (°C)
Actin_fwd	TGACATCAAGGAGAAGCTGTG	103	61,0
Actin_rvs	GTCGGGAAGTTCGTAGGATTT		61,0
Actin_sonda	TCGCCCTGGACTTTGAACAGGAAA		65,0
IA_fwd	GGCTGAACTGTCTCCATTCTAT	136	62,0
IA_rvs	GAACTCAGGTTCTGTGTCTTCT		62,0
IA_sonda	TGCTTGTTTACCTATCTGCCCACTCC		68,0
ATA_fwd	ACTCATCACTGACGGGAGAA	105	63,0
ATA_rvs	CAGCGTTGGTCGAGAAGAAG		63,0
ATA_sonda	TGACTTCACCAACGACAATCCGCT		68,0
ATD_fwd	CCAACCTTCTGGCCTCAT	98	61,0
ATD_rvs	TGGTTGGTGGAGACCACTA		62,0
ATD_sonda	TCACAAAGGAAGATGAAGAATGGTGGGA		68,0
CD_fwd	GCTAATGGACCTGCCAAAGT	98	63,0
CD_rvs	TTTGTTCAGTGAGGGTGAAG		62,0
CD_sonda	TGGACATTATTCTGGGCGGCAAGA		68,0
CL_fwd	CAAGCTGAAAGCTGCTGTG	138	62,0
CL_rvs	AGAACAGCGTGGTCTAACTG		62,0
CL_sonda	TCGACGCTAGTCATCAGAGCTTCCA		68,0
CS_fwd	TCAGCATGGCGGGTTAAG	121	62,0
CS_rvs	CTCCGCGGAATGACATGAATA		62,0
CS_sonda	TGCCTTCGTGTCATTCTCAAGATCC		68,0
TR_fwd	ACGGTGGCAGAGTGTAATA	106	62,0
TR_rvs	CTCTCGTTGAGAACTGCAAATC		62,0
TR_sonda	TGGTAAAGTCCTACATTGATGCCACCA		68,0

<sup>1</sup>Sigla dos primers e sondas utilizados nas análises de expressão relativa dos genes específicos de *D. citri*. Actin: actina-normalizador; ATD: *ATP synthase subunit-D like mitochondrial*; ATA: *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase-A*; CD: *Cathepsin D*; CL: *Cathepsin L*, CS: *Chitin synthase*; IA: *Inhibitor of apoptosis*; TR: *Trehalase*. Fwd: primer forward; rvs: primer reverse.

O efeito de dsRNAs nos níveis de expressão dos genes alvo foi quantificado por qRT-PCR utilizando *iTAQ<sup>TM</sup> Universal Probes Supermix* (Bio-Rad®). O gene *actina* de *D. citri* foi utilizado como normalizador para as reações de expressão gênica (Tab. 2). Para esta reação foram utilizados 10 µL de *iTAQ Universal Probes Supermix* (2X); 0,18 µL de *forward* e *reverse primers* de cada gene alvo (5 µM); 0,18 µL *forward* e *reverse primers* do gene *actina* (5 µM); 0,25 µL de sonda de cada gene (1 µM) e 0,25 µL de sonda de *actina* (1 µM); 6 µL de cDNA e água livre de nucleotídeos para um volume final de 20 µL. As curvas padrão de amplificação de cada gene alvo e *actin* foram realizadas por meio de diluições seriadas do cDNA para

verificar a eficiência de amplificação de cada par de *primers* sob as mesmas condições. As reações de amplificações foram realizadas no aparelho *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad®) e as condições da reação foram 3min a 95°C acompanhados por 40 ciclos de 10 s a 95 °C, 30 s a 59 °C para anelamento dos *primers* e sondas.

Os dados observados na expressão relativa foram analisados utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta CQ}$ . O valor  $\Delta CQ$  das amostras foi obtido subtraindo-se o valor médio CQ para a *actin* a partir do valor médio CQ para o transcrito alvo. DsRNA GFP foi seleccionado como amostra de referência. O valor  $\Delta\Delta CQ$  das amostras foi obtido subtraindo-se o valor  $\Delta CQ$  da amostra de referência a partir do valor  $\Delta CQ$  da amostra de teste. A abundância relativa do transcrito alvo, em comparação com o nível de *actin* em cada amostra é representada pelo valor  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

#### 4.12. Análise estatística

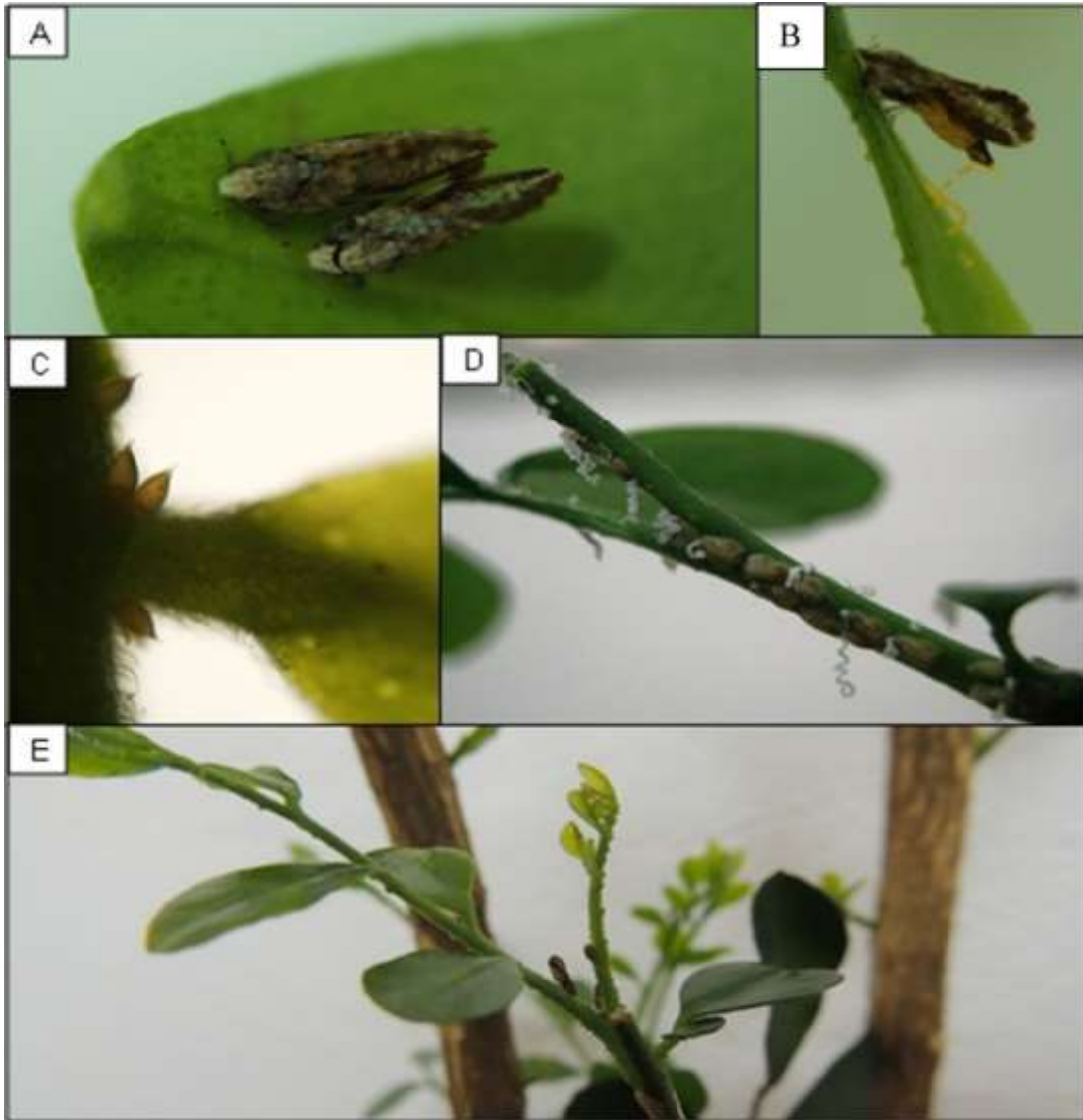
Os resultados obtidos nos experimentos dieta artificial, de ingestão de dsRNAs via dieta artificial e planta, e expressão gênica foram submetidos à análise de variância e aplicado o teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram analisadas no programa Assistat versão 7.7 Beta. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Criação e manutenção dos insetos

A criação de *D. citri* foi estabelecida no Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’ do Instituto Agronômico de Campinas/SP. Após a montagem da gaiola com três plantas de murta e 180 insetos para realizar a postura de ovos, pode ser observado por sete dias, insetos se acasalando e fêmeas realizando a postura de ovos em brotos das plantas. Os adultos foram retirados das plantas para que todos os insetos que assim fossem emergir de ninfas tivessem a mesma idade. Assim, por 15 dias pode ser observado todos os cinco estádios de desenvolvimento (ínstares) de ninfas, além da produção da excreção de cor branca denominada *honeydew* pelas ninfas, e ao final deste período, os insetos adultos emergiram de ninfas de 5º instar. Os insetos adultos tiveram preferência de ficar nos brotos das plantas e também na parte abaxial das folhas (Fig. 6).





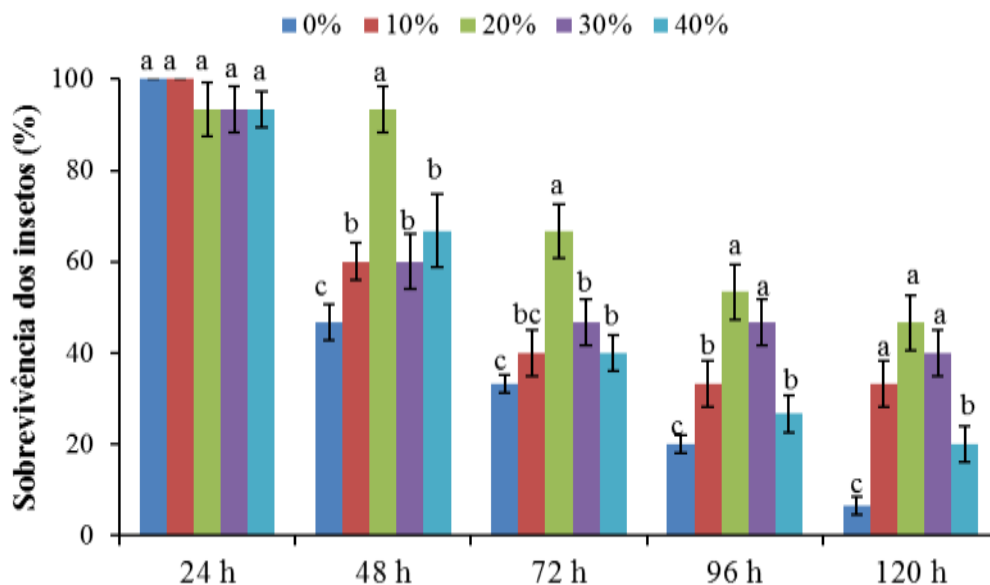
**Figura 6.** Criação de *Diaphorina citri* no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira em mudas de murta. A) Acasalamento de insetos adultos; B) Fêmea fazendo a postura de ovos em brotação; C) Ovos; D) Ninfas se alimentando em brotação e produzindo *honeydew*; E) Inseto adulto na planta.

Os resultados que foram obtidos na criação de *D. citri* em laboratório corroboram os relatos de Nava et al. (NAVA et al., 2007) que demonstraram que os adultos atingem maturidade sexual por volta de 10 dias após a emergência, sendo que as fêmeas podem colocar até 800 ovos durante o período de postura de ovos. Os ovos são depositados em brotações novas e nas reentrâncias das folhas e apresentam-se em forma de amêndoas e de coloração amarelo-alaranjado. As ninfas são de cor amarelo palha, pequenas, achatadas dorso-ventralmente e apresentam cinco ínstar, permanecendo grande parte do tempo agregadas e se alimentam das

partes mais jovens da planta, como folhas novas, parte terminal do pecíolo, entre a gema axilar e em brotações (LIU; TSAI, 2000)

### 5.2. Seleção de dieta artificial para *D. citri* em sistema de alimentação *in vitro*

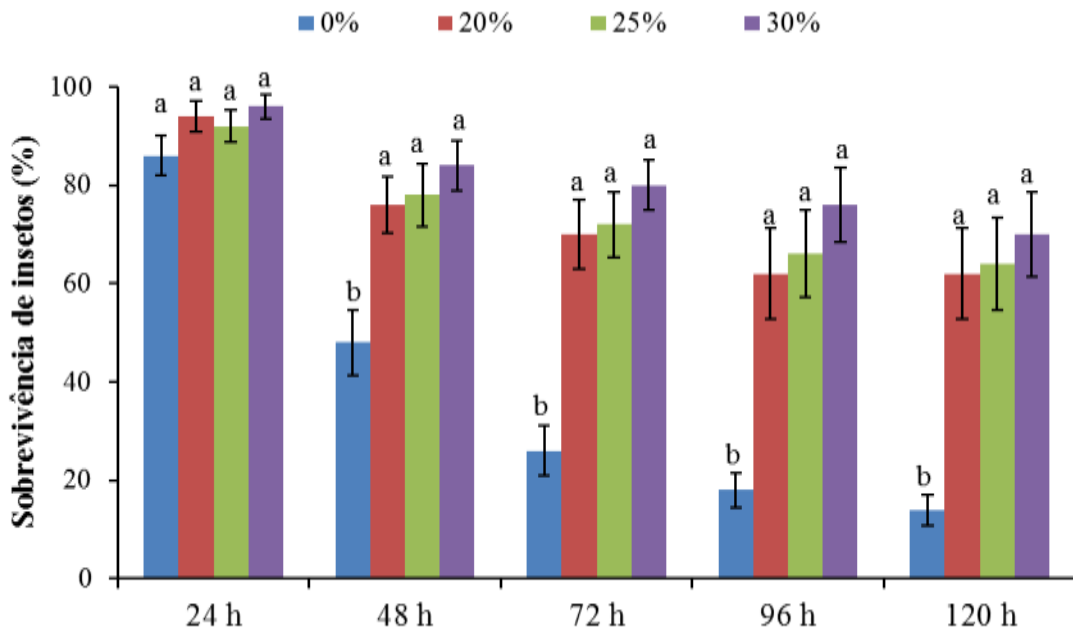
Afim de selecionar a dieta artificial que proporciona a maior porcentagem de sobrevivência de insetos adultos em sistema de alimentação *in vitro* durante cinco dias, foram realizados testes prévios com dietas artificiais contendo 10, 20, 30 e 40 % de sacarose, sendo que as concentrações 20 e 30 % apresentaram 47 e 42 % de porcentagem de sobrevivência dos insetos após os 5 dias avaliados, respectivamente, e também foram os melhores tratamentos quando comparados às dietas artificiais contendo 10 e 40 % de sacarose que demonstraram 33 e 20 % de insetos vivos após 120 h, respectivamente (Fig. 7).



**Figura 7.** Sobrevivência de *D. citri* durante cinco dias em sistema de dieta artificial contendo sacarose nas concentrações 0, 10, 20, 30 e 40 %. Diferenças estatísticas entre os tratamentos no mesmo tempo avaliado estão demonstradas com diferentes letras ( $P < 0,01$ ).

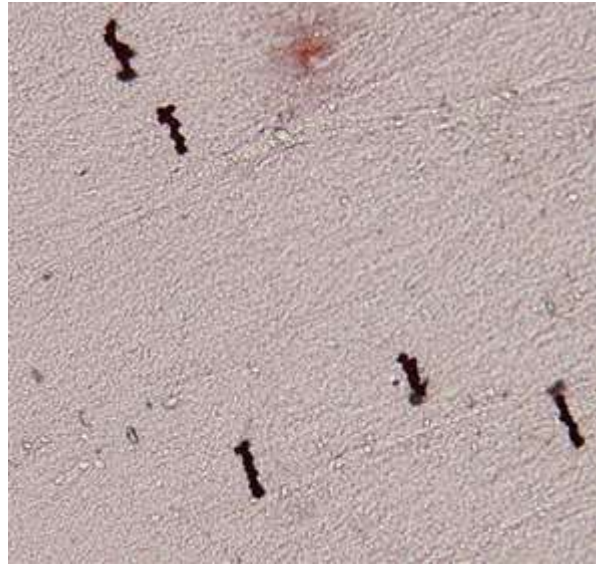
A partir destes dados, foram testadas as concentrações de 0, 20, 25 e 30 % de sacarose para estabelecer a melhor concentração que seria utilizada como dieta artificial para os testes posteriores com dsRNAs. Pode-se constatar que após 48 h houve diferença significativa entre os tratamentos com e sem sacarose (Fig. 8). Após cinco dias, a porcentagem de sobrevivência dos insetos adultos nas gaiolas com dieta artificial foi de 62, 64 e 70 % nas concentrações 20, 25 e 30 % de sacarose, respectivamente, enquanto no tratamento 0 % de

sacarose foi de apenas 14 %. Assim, pode-se concluir que este sistema de alimentação de dieta artificial composto por sacarose para esta população de *D. citri*, estabelecida no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’/IAC, é promissor para avaliar insetos adultos por períodos de até 120 horas.



**Figura 8.** Sobrevivência de *D. citri* durante cinco dias em sistema de dieta artificial contendo sacarose nas concentrações 0, 20, 25 e 30 %. Diferenças estatísticas entre os tratamentos no mesmo tempo avaliado estão demonstradas com diferentes letras ( $P < 0,01$ ).

Ao final do ensaio de sobrevivência dos insetos nas dietas artificiais pode se comprovar a atividade alimentar dos insetos no sistema de alimentação *in vitro* que pode ser determinada pela observação e quantificação de bainhas salivares coradas com safranina 0,1 % nas membranas de Parafilm® (Fig. 9). Este é um método bastante utilizado em experimentos voltados a comprovar a alimentação de insetos sugadores em sistema dieta artificial com membranas de Parafilm® (HALL et al., 2010; YOUNG; SHIELDS; BERLYN, 1995). Além disso, de acordo com a Tabela 3, pode-se observar que houve maior quantidade de bainhas salivares coradas com safranina 0,1 % nas membranas de Parafilm® das dietas artificiais de sacarose (20, 25 e 30 %), o que foi significativo quando comparadas à dieta de sacarose 0 %, demonstrando maior atividade alimentar dos insetos nos sistemas compostos por sacarose.



**Figura 9.** Bainhas salivares de insetos adultos de *D. citri* coradas com safranina 0,1 % na membrana de Parafilm® de dieta artificial de sacarose 30 %. Aumento de 100x.

**Tabela 3.** Número de bainhas estiletas de insetos adultos de *D. citri* presentes na membrana de Parafilm® após 120 h no sistema de alimentação *in vitro*.

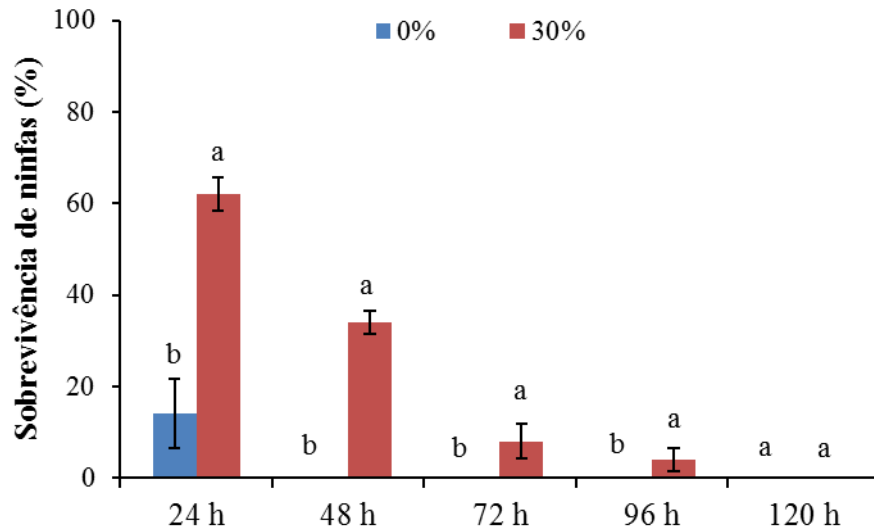
Dieta artificial <sup>1</sup>	Número médio de bainhas salivares <sup>2</sup>
Sacarose 0 %	6,85 ± 0,35b
Sacarose 20 %	12,40 ± 0,87a
Sacarose 25 %	13,17 ± 1,92a
Sacarose 30 %	15,37 ± 1,77a

<sup>1</sup>Dieta artificial composta por sacarose 0, 20, 25 e 30 %, água destilada deionizada e corantes alimentícios verde e amarelo.

<sup>2</sup>Média ± erro padrão do número bainhas salivares de insetos adultos após 120 h de avaliação e coradas com safranina 0,1 %. Médias da  $\Sigma$  de duas áreas (5 x 5 mm) ± erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,01%).

Entretanto, nos ensaios que continham ninfas de 3º instar se alimentando de sacarose 0 e 30 %, apresentaram baixa porcentagem de sobrevivência ao longo dos cinco dias de avaliação (Fig. 10) e pode-se observar deformações nos corpos das ninfas mortas (Fig. 11). Após 48 h, todas as ninfas da dieta de sacarose 0 % já estavam mortas enquanto que na dieta de sacarose 30 % a sobrevivência das ninfas reduziu de 62 % para 0 %, entre 24 h e 120 h. Também pode ser observado na Tabela 4 que não houve diferença significativa do número de bainhas estiletas presentes nas membranas de Parafilm® entre as dietas artificiais de 0 e 30 % de sacarose. Além disso, pode-se observar que as ninfas não ficam por muito tempo se alimentando da dieta artificial nas membranas e locomovem-se por toda a área interna da gaiola

de plástico, assim, muitas ninfas não conseguem retornar para região onde se encontra a membrana em contato com a dieta artificial e morrem, provavelmente, por inanição. Assim, pode-se inferir que este sistema de alimentação artificial para ninfas de 3º instar de *D. citri* não é adequado para avaliar a sobrevivência dos insetos neste estágio de desenvolvimento.



**Figura 10.** Porcentagem da média de sobrevivência de ninfas de 3º instar de *D. citri* no sistema de alimentação *in vitro* nas concentrações de sacarose 0 e 30 %. Diferenças estatísticas entre os tratamentos no mesmo tempo avaliado estão demonstradas com diferentes letras ( $P < 0,01$ ).

**Tabela 4.** Número de bainhas estiletas de insetos adultos de *D. citri* presentes na membrana de Parafilm® após 120 h no sistema de alimentação *in vitro*.

Dieta artificial <sup>1</sup>	Número médio de bainhas salivares <sup>2</sup>
Sacarose 0 %	3,60 ± 0,92a
Sacarose 30 %	4,80 ± 0,52a

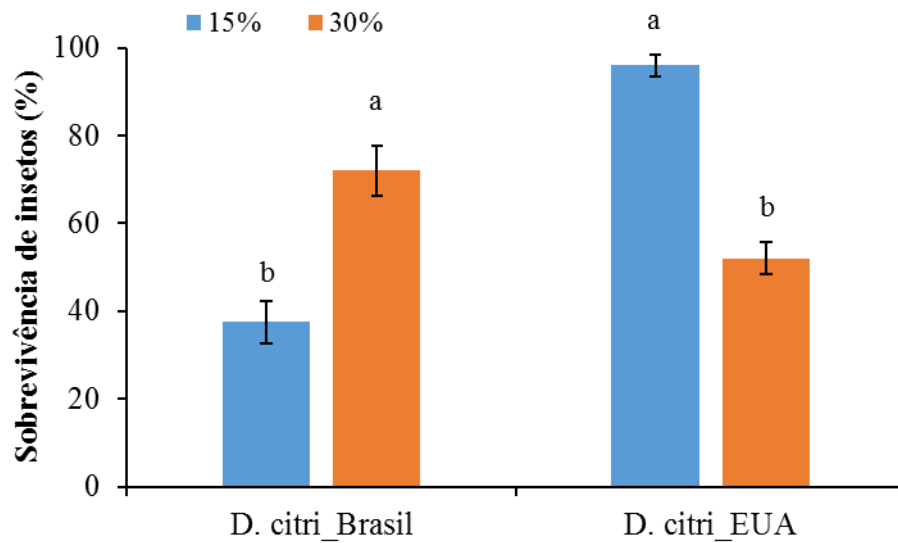
<sup>1</sup>Dieta artificial composta por sacarose 0, 20, 25 e 30 %, água mineral e corantes alimentícios verde e amarelo. Controle negativo: sem dieta artificial.

<sup>2</sup>Média ± erro padrão do número bainhas salivares de insetos adultos após 120 h de avaliação e coradas com safranina 0,1%. Médias da  $\Sigma$  de duas áreas (5 x 5 mm) ± erro padrão seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,01\%$ ).



**Figura 11.** Ninfas de *D. citri* em sistema de alimentação de dieta artificial. A: Ninfas se alimentando da dieta artificial e produzindo *honeydew*. B: Exúvia (exoesqueleto) de ninfa em membrana de Parafilm®. C: Ninfas mortas após 96 h.

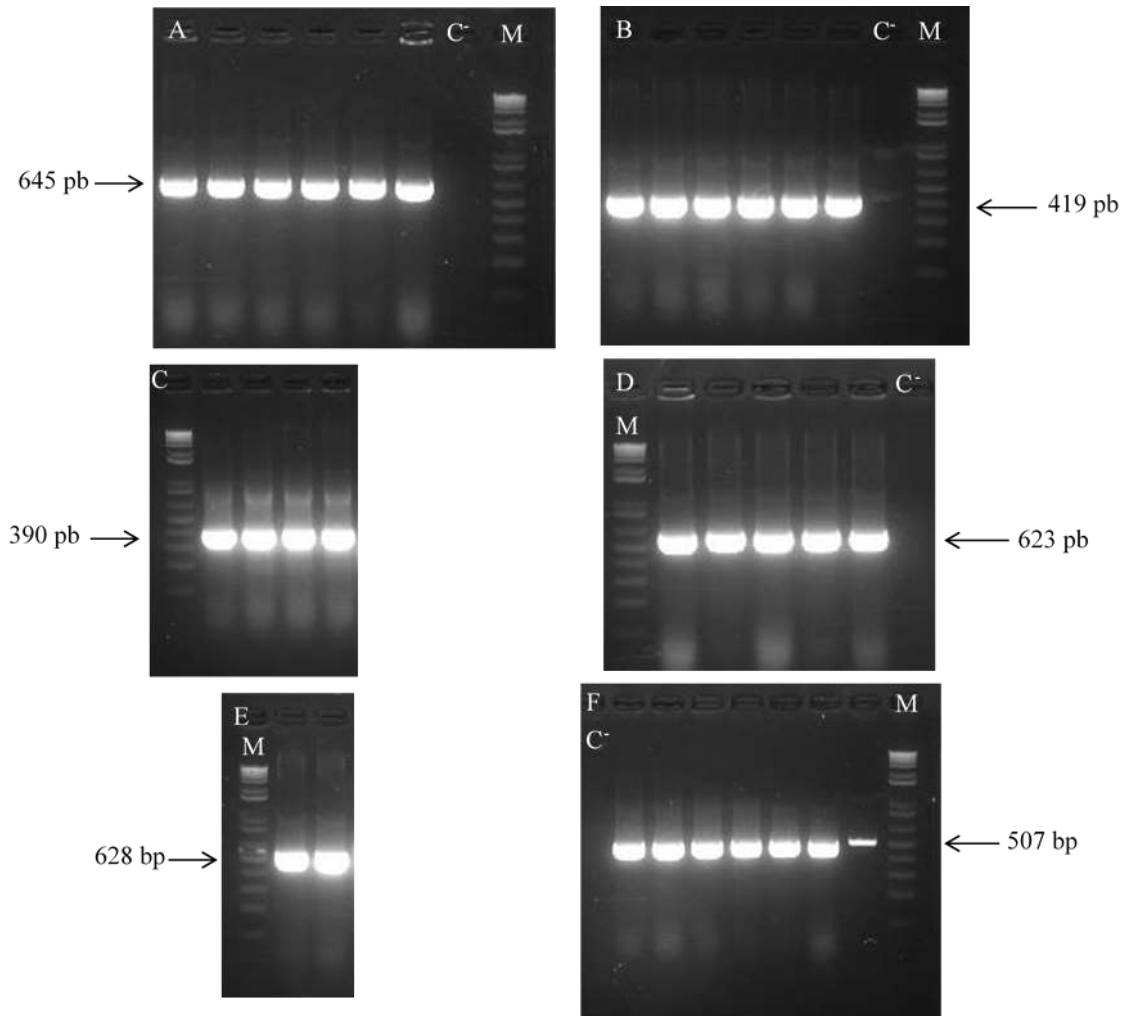
Também foi realizado um ensaio para avaliar a taxa de sobrevivência de duas diferentes populações de *D. citri*, estabelecidas no CCSM e na UCDavis, no sistema de alimentação de dieta artificial com 15 e 30% de sacarose. Ao final de 120 h pode ser observado que a taxa de sobrevivência da população de psílídeos estabelecida no CCSM foi de 37,5 e 72% ao ingerir dieta artificial nas concentrações 15 e 30% de sacarose, respectivamente. Porém, a taxa de sobrevivência da população de psílídeos estabelecida na UCDavis foi de 96 e 52% nas concentrações 15 e 30% de sacarose, respectivamente, assim demonstrando que as duas populações de *D. citri* utilizados neste experimento, exibem comportamentos distintos no sistema de alimentação *in vitro* utilizado neste trabalho.



**Figura 12.** Porcentagem de sobrevivência de populações *D. citri* estabelecidas nos Estados Unidos e Brasil em sistema de alimentação *in vitro* nas concentrações de sacarose 15 e 30% após 120h. Diferenças estatísticas entre os tratamentos no mesmo tempo avaliado estão demonstradas com diferentes letras ( $P < 0,01$ ).

### 5.3. Validação de *primers* específicos e síntese de dsRNAs

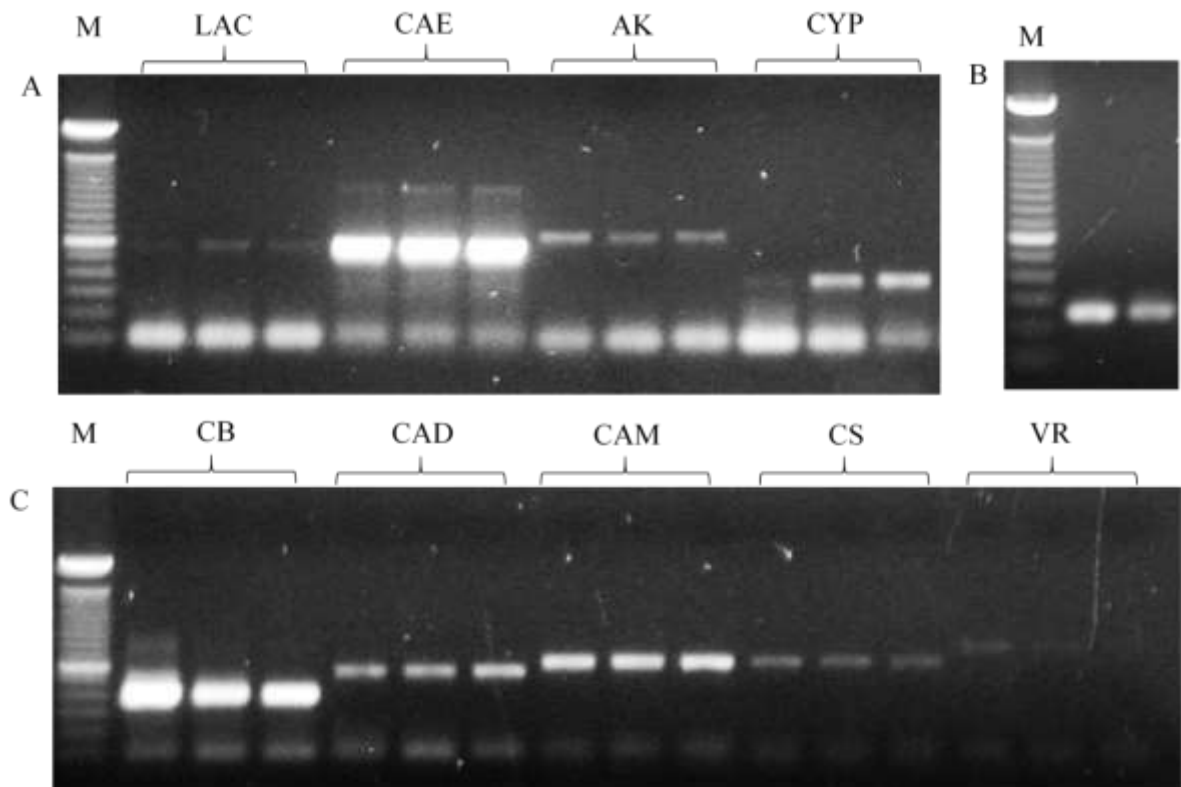
A partir da anotação das sequências do transcriptoma e genoma de *D. citri* foram selecionados 16 genes candidatos para avaliação nos experimentos de RNAi: *arginine kinase*, *ATP synthase subunit-D like mitochondrial*, *V-ATP synthase subunit-E*, *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase-A*, *cathepsin B*, *cathepsin D*, *cathepsin L*, *carboxypeptidase D*, *carboxypeptidase E*, *carboxypeptidase M*, *chitin synthase*, *cytochrome P450 monooxygenase (CYP4C68)*, *inhibitor of apoptosis*, *laccase 2*, *trehalase* e *vitellogenin receptor*. Para validar a especificidade dos *primers* foi realizada a reação de amplificação de cDNA de insetos jovens de *D. citri*. Na Figura 13 pode ser observado os fragmentos em gel de agarose 2 % resultantes da amplificação dos genes *inhibitor of apoptosis*, *trehalase*, *cathepsin D*, *cathepsin L*, *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase-A* e *ATP synthase subunit-D like mitochondrial*.



**Figura 13.** Amplificação dos fragmentos de genes alvos de *D. citri*. A: *Inhibitor of apoptosis* (645 pb); B: *Trehalase* (419 pb); C: *Cathepsin D* (390 pb); D: *Cathepsin L* (623 pb); E: *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase-A* (628 pb); F: *ATP synthase subunit-D like mitochondrial* (507 pb).

Figura 14 pode ser observado os fragmentos em gel de agarose 2 % resultantes da amplificação dos genes *laccase 2*, *arginine kinase*, *V-ATP synthase subunit-E*, *cathepsin B*, *carboxypeptidase D*, *carboxypeptidase E*, *carboxypeptidase M*, *chitin synthase*, *cytochrome P450 monooxygenase (CYP4C68)*, e *vitellogenin receptor*.

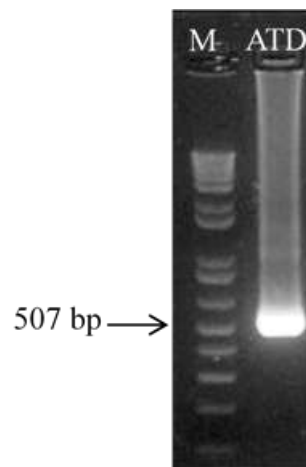




**Figura 14.** Amplificação dos fragmentos de genes alvos de *D. citri*. A: *laccase 2* (534 pb), *carboxypeptidase E* (549 pb), *arginine kinase* (625), *cytochrome P450 monooxygenase (CYP4C68)* (332 pb); B: *V-ATP synthase subunit-E* (251 pb); C: *cathepsin B* (370 pb), *carboxypeptidase D* (542 pb), *carboxypeptidase M* (574 pb), *chitin synthase* (500 pb) e *vitellogenin receptor* (776 pb). LAC: *laccase 2*; CAE: *carboxypeptidase E*; AK: *arginine kinase*; CYP: *cytochrome P450 monooxygenase (CYP4C68)*; CB: *cathepsin B*; CAD: *carboxypeptidase D*; CAM: *carboxypeptidase M*; CS: *chitin synthase*; VR: *vitellogenin receptor*. M: Marcador molecular (100 pb).

Após a validação dos *primers* para cada gene candidato, o fragmento amplificado da sequência codante de cada gene alvo foi purificado, sequenciado e após alinhamento no BLAST pode-se confirmar a especificidade dos *primers* utilizados para amplificação dos genes candidatos. Na etapa seguinte, foram selecionados sete genes alvos dentre os 16 genes candidatos para os ensaios de RNAi em *D. citri*. Assim, foi realizada a amplificação das regiões codantes dos genes *ATP synthase subunit-D like mitochondrial*, *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase-A*, *cathepsin D*, *cathepsin L*, *chitin synthase*, *inhibitor of apoptosis*, *trehalase* utilizando *primers forward* e *reverse* de cada gene com sequência do promotor T7, após esta etapa, foi realizada a reação de transcrição *in vitro* dos genes alvos. Na Figura 15 pode ser observado sob luz UV, moléculas

de dsRNA do gene *ATP synthase subunit-D like mitochondrial* em gel de agarose 2 %. Um fragmento de 325 pb do gene GFP (*Green Fluorescent Protein*) foi amplificado do plasmídeo pJL24 utilizando *primer forward* (5'-TACGGCGTGCAGTGCTTCA-3') e *reverse* (5'-CGTCCTCGATGTTGTGGCG-3'), ambos com promotor T7, e transcrito para dsRNA para ser utilizado como controle nos ensaios de alimentação de *D. citri*. Ao término da transcrição *in vitro* das moléculas de dsRNAs para todos os genes alvos e GFP, estes foram armazenados à temperatura de -20 °C para posterior utilização nos ensaios de alimentação de *D. citri* em dieta artificial e em ramos de murta.

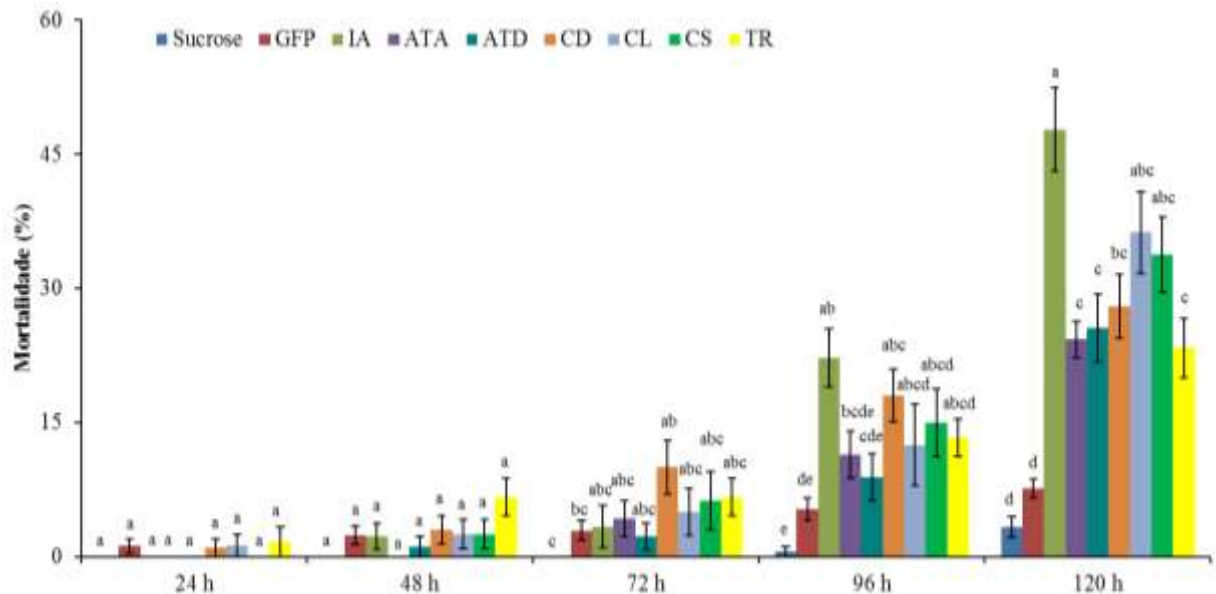


**Figure 15.** Moléculas de dsRNA de *ATP synthase subunit-D like mitochondrial* em gel de agarose 2 %. M: Marcador molecular (100 pb).

#### 5.4. Avaliação dos efeitos de dsRNAs em dieta artificial para *D. citri*

Durante cinco dias foi contabilizado o número de insetos adultos de *D. citri* mortos após ingerirem dieta artificial de sacarose 30 % contendo diferentes concentrações de dsRNAs (200, 500 e 1000 ng.µL<sup>-1</sup>) para cada gene alvo (*ATP synthase subunit-D like mitochondrial*, *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase-A*, *cathepsin D*, *cathepsin L*, *chitin synthase*, *inhibitor of apoptosis*, *trehalase*). Soluções de dsRNA de GFP nas mesmas concentrações dos dsRNAs de genes alvos e solução de sacarose 30 % foram utilizadas como controles das concentrações de dsRNAs e da dieta artificial, respectivamente. Nos três ensaios de alimentação de dieta artificial contendo as diferentes concentrações de dsRNAs (200, 500 e 1000 ng.µL<sup>-1</sup>), os psilídeos que ingeriram solução de sacarose começaram a morrer a partir de 96 h chegando a uma taxa de mortalidade inferior a 5 % após 120 h de avaliação, assim demonstrando a eficiência do sistema de dieta artificial (Fig. 16, 17 e 18). Os sete tratamentos com os dsRNAs dos genes alvos na concentração 200 ng.µL<sup>-1</sup> demonstraram diferenças significativas quando comparados ao tratamento controle com dsRNA de GFP após 120 h (Fig. 16). Foi significativamente maior o número de insetos

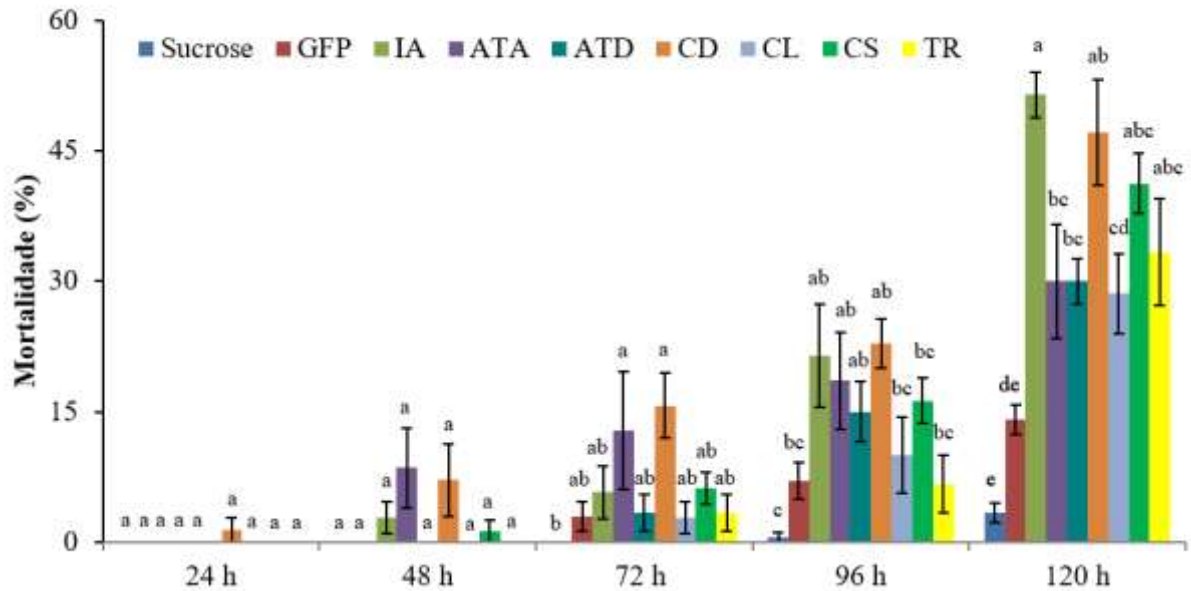
mortos na concentração de  $200 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de dsRNA do gene *inhibitor of apoptosis* demonstrando 48 % de mortalidade, enquanto que dsRNA do gene *trehalase* causou menor taxa de mortalidade dos insetos após cinco dias. Nas mesmas condições experimentais, os dsRNAs  $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATPase-A}$ , *ATP synthase subunit-D like mitochondrial cathepsin D*, *cathepsin L* e *chitin synthase* causaram 24, 25, 28, 36 e 34 % de mortalidade, respectivamente.



**Figure 16.** Avaliação da taxa de mortalidade de *D. citri* durante cinco dias em sistema de dieta artificial contendo dsRNAs de *ATP synthase subunit-D like mitochondrial*,  $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATPase-A}$ , *cathepsin D*, *cathepsin L*, *chitin synthase*, *inhibitor of apoptosis*, *trehalase*. Solução de sacarose 15 % e dsRNAs GFP na concentração  $200 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , foram utilizados como controle da dieta artificial e controle das concentrações de dsRNAs, respectivamente. Diferenças estatísticas entre os tratamentos no mesmo tempo avaliado estão demonstradas com diferentes letras ( $P < 0,01$ ).

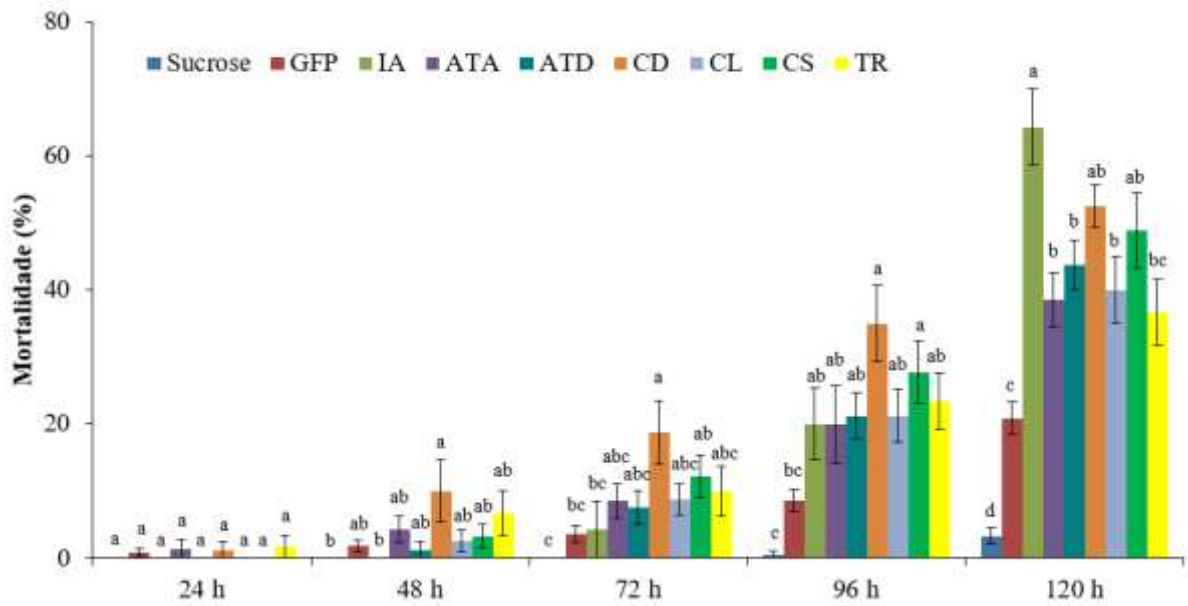
Os tratamentos contendo dsRNAs na concentração  $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  dos genes *ATP synthase subunit-D like mitochondrial*,  $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ATPase-A}$ , *cathepsin D*, *chitin synthase*, *inhibitor of apoptosis* e *trehalase* exibiram diferenças significativas quando comparados ao controle dsRNA de GFP após cinco dias (Fig. 17). Além disso, pode ser observado que o tratamento com dsRNAs de *inhibitor of apoptosis* exibiu 51 % de mortalidade dos insetos e foi o mais efetivo em comparação com os outros tratamentos, enquanto que no mesmo experimento, o tratamento com dsRNA de *cathepsin L* causou a menor porcentagem de mortalidade dos insetos. Nas mesmas condições experimentais, os tratamentos dsRNAs de *ATP*

*synthase subunit-D like mitochondrial*,  $Na^+/K^+$  ATPase-A, *cathepsin D*, *chitin synthase* e *trehalase* causaram 30, 30, 47, 41 e 33 % de mortalidade, respectivamente.



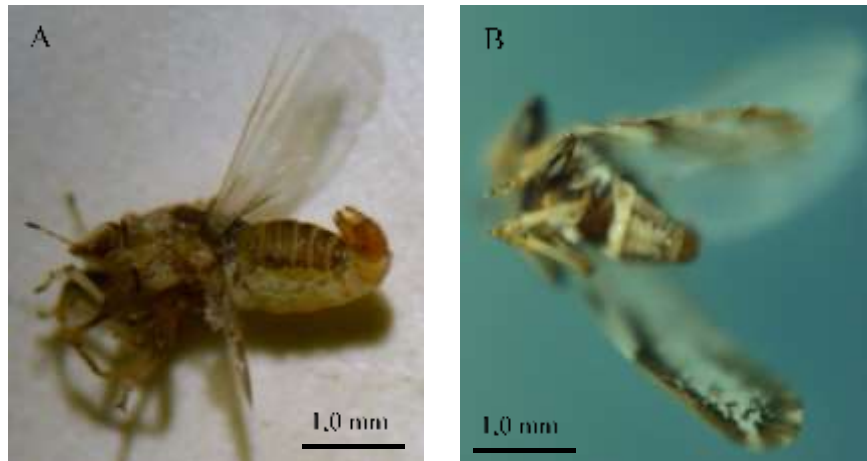
**Figure 17.** Avaliação da taxa de mortalidade de *D. citri* durante cinco dias em sistema de dieta artificial contendo dsRNAs de *ATP synthase subunit-D like mitochondrial*,  $Na^+/K^+$  ATPase-A, *cathepsin D*, *cathepsin L*, *chitin synthase*, *inhibitor of apoptosis*, *trehalase*. Solução de sacarose 15 % e dsRNAs GFP na concentração  $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , foram utilizados como controle da dieta artificial e controle das concentrações de dsRNAs, respectivamente. Diferenças estatísticas entre os tratamentos no mesmo tempo avaliado estão demonstradas com diferentes letras ( $P < 0,01$ ).

Seis tratamentos de dsRNAs, *ATP synthase subunit-D like mitochondrial*,  $Na^+/K^+$  ATPase-A, *cathepsin D*, *cathepsin L*, *chitin synthase*, *inhibitor of apoptosis*, na concentração  $1000 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , demonstraram diferenças significativas quando comparados com dsRNA GFP após 120 h (Fig. 18), sendo que apenas o tratamento com dsRNA *trehalase* não foi significativo quando comparado a este controle. Além disso, pode ser observado que o tratamento de dsRNA de *inhibitor of apoptosis* causou 63% de mortalidade dos insetos enquanto dsRNA *trehalase* se mostrou menos eficaz causando a morte de 37% dos psilídeos. Nas mesmas condições experimentais, os tratamentos de dsRNA de *ATP synthase subunit-D like mitochondrial*,  $Na^+/K^+$  ATPase-A, *cathepsin D*, *cathepsin L* e *chitin synthase* causaram 39, 44, 52, 40 e 48% de mortalidade nos insetos após 120 h, respectivamente.

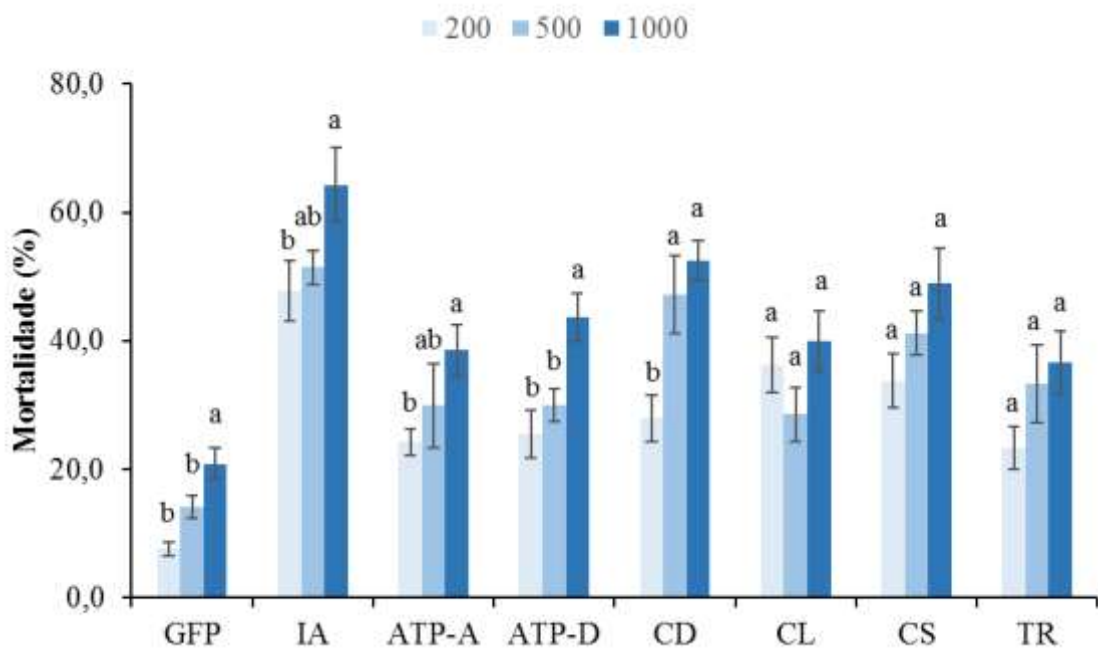


**Figure 18.** Avaliação da taxa de mortalidade de *D. citri* durante cinco dias em sistema de dieta artificial contendo dsRNAs de *ATP synthase subunit-D like mitochondrial*,  $Na^+/K^+$  *ATPase-A*, *cathepsin D*, *cathepsin L*, *chitin synthase*, *inhibitor of apoptosis*, *trehalase*. Solução de sacarose 15 % e dsRNAs GFP na concentração  $1000 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , foram utilizados como controle da dieta artificial e controle das concentrações de dsRNAs, respectivamente. Diferenças estatísticas entre os tratamentos no mesmo tempo avaliado estão demonstradas com diferentes letras ( $P < 0,01$ ).

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de alimentação pode ser observado que a taxa de mortalidade dos insetos em todos os tratamentos aumentou ao longo do tempo e também pode ser observado que a região abdômnal dos insetos mortos estavam reduzidos em comparação aos insetos vivos (Fig. 19). Além disso, houve maior mortalidade dos insetos à medida que houve aumento da concentração de dsRNAs de genes alvos *ATP synthase subunit-D like mitochondrial*,  $Na^+/K^+$  *ATPase-A*, *cathepsin D*, *cathepsin L*, *chitin synthase*, *inhibitor of apoptosis*, *trehalase* depois de 120 h e também do controle GFP, porém este aumento na taxa de mortalidade de insetos sendo estatisticamente significativo apenas nos tratamentos de dsRNAs de GFP, *inhibitor of apoptosis*,  $Na^+/K^+$  *ATPase-A*, *ATP synthase subunit-D like mitochondrial* e *cathepsin D*. Por outro lado, o tratamento contendo dsRNAs de *cathepsin L* na concentração  $200 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  demonstrou maior taxa de mortalidade quando comparado à concentração  $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  após 120 h, mas não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de dsRNAs deste gene na mortalidade dos insetos (Figura 20).



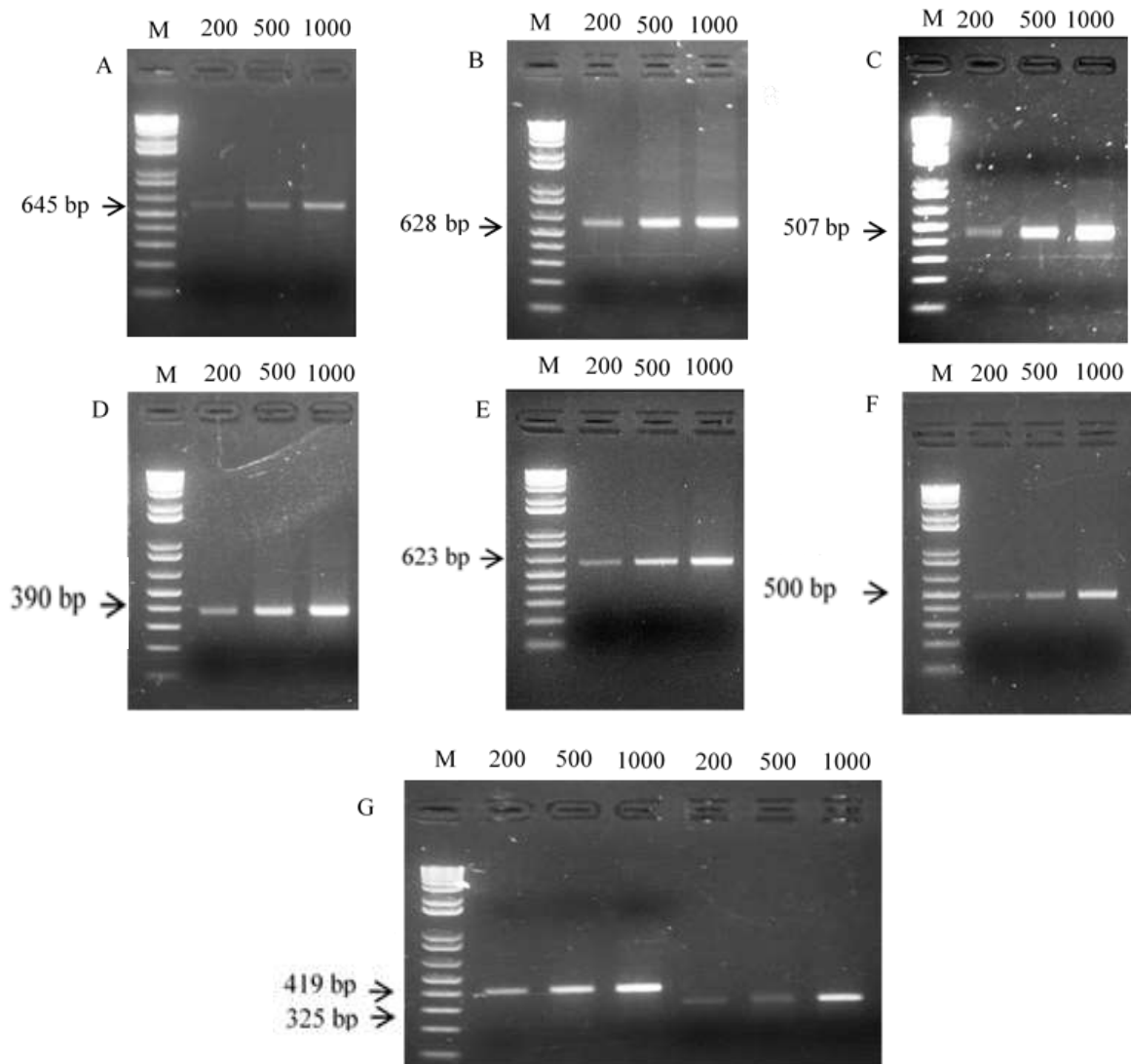
**Figura 19.** Insetos adultos de *D. citri* em sistema de alimentação de dieta artificial composto por sacarose 15% após 120h. A: Inseto macho vivo. B: Inseto macho morto.



**Figura 20.** Avaliação da taxa de mortalidade de *D. citri* após 120h em sistema de dieta artificial contendo dsRNAs de *ATP synthase subunit-D like mitochondrial*, *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase-A*, *cathepsin D*, *cathepsin L*, *chitin synthase*, *inhibitor of apoptosis*, *trehalase* e GFP nas concentrações 200, 500 e 1000 ng.µL<sup>-1</sup>. Diferenças estatísticas entre os tratamentos no mesmo tempo avaliado estão demonstradas com diferentes letras (P<0,01).

### 5.5. Avaliação da estabilidade de dsRNAs em solução dieta artificial

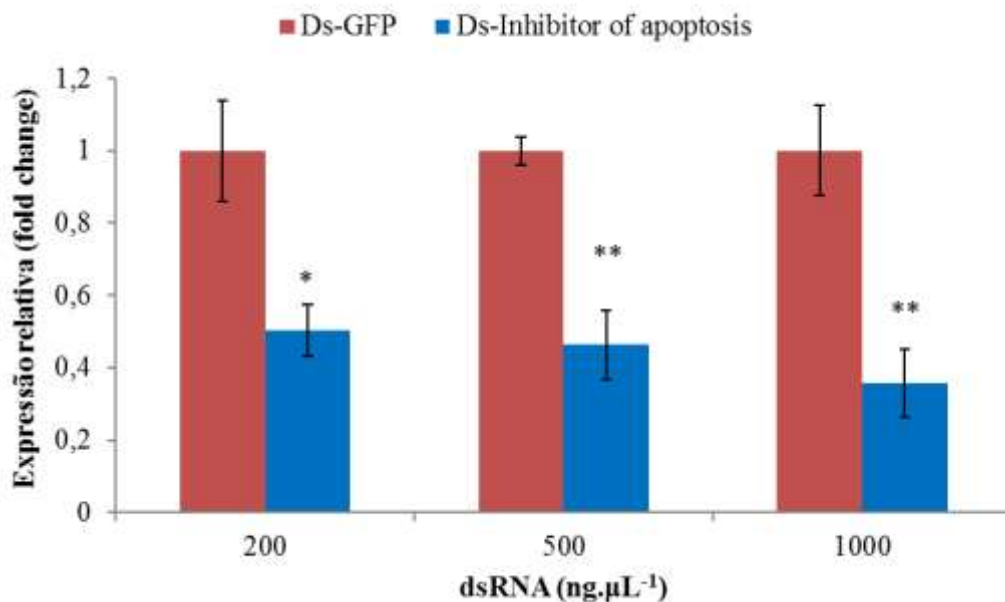
A estabilidade dos dsRNAs de cada gene alvo e GFP em solução de dieta artificial foi avaliada para validação de RNAi neste sistema. Os dsRNAs dos sete genes alvos e GFP foram utilizados nas concentrações 200, 500 e 1000 ng.μL<sup>-1</sup> e, após o quinto dia dos bioensaios, puderam ser observados em gel de agarose 2 % com brometo de etídeo (Fig. 21). Assim, este sistema de silenciamento de genes se mostrou estável por não ocorrer degradação das moléculas de dsRNAs presentes na dieta artificial após a ingestão feita pelos insetos.



**Figura 21.** Estabilidade dos dsRNAs em dieta artificial. Após 120 h dos bioensaios as diferentes concentrações de dsRNAs (200, 500 e 1000 ng.μL<sup>-1</sup>) em dieta artificial foram examinados em gel de agarose sob luz ultravioleta. A: *Inhibitor of apoptosis* (645 pb); B: *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase-A* (628 pb); C: *ATP synthase subunit-D like mitochondrial* (506 pb); D: *cathepsin D* (390 pb); E: *cathepsin L*, (623 pb); F: *Chitin synthase* (500 pb); G: *Trehalase* (419 pb) e GFP (325 pb).

### 5.6. Avaliação da expressão de genes de *D. citri* após ingestão de dsRNAs em dieta artificial

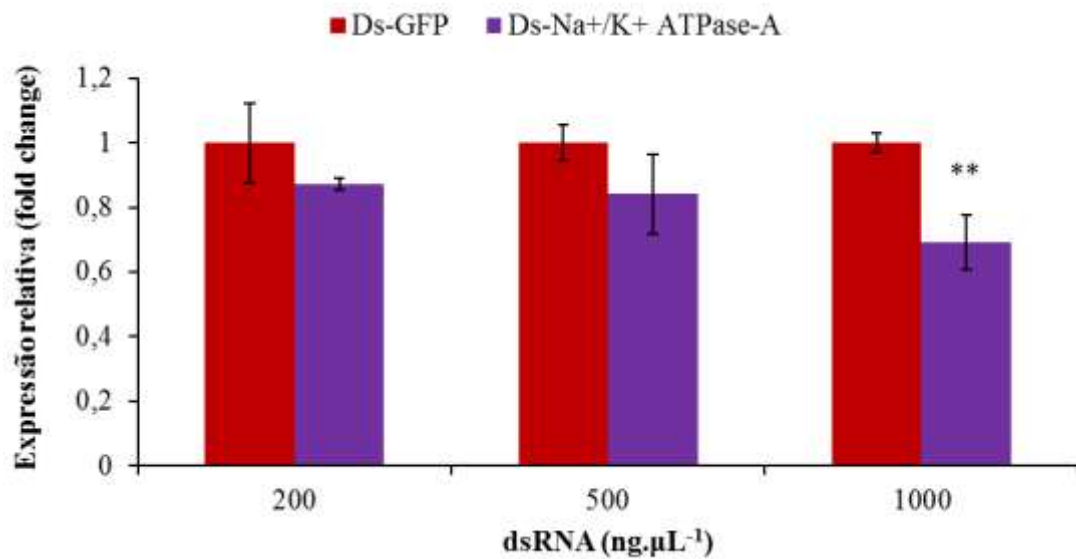
A fim de determinar se moléculas de dsRNAs ingeridas em dieta artificial induziram efeitos de RNAi em *D. citri*, foi realizada a quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real para avaliar os níveis de RNA mensageiro dos genes alvo do inseto. Os psilídeos foram coletados após o término do quinto dia em sistema de alimentação artificial com as concentrações 200, 500 e 1000 ng.µL<sup>-1</sup> de dsRNAs. Estas análises revelaram que em todos os tratamentos houve redução na expressão gênica de cada gene alvo em comparação com os tratamentos com dsRNAs GFP. Nos tratamentos com dsRNAs nas concentrações 200, 500 e 1000 ng.µL<sup>-1</sup> do gene *inhibitor of apoptosis* houve redução de 50, 54 e 65 %, na expressão deste gene, respectivamente (Fig. 22).



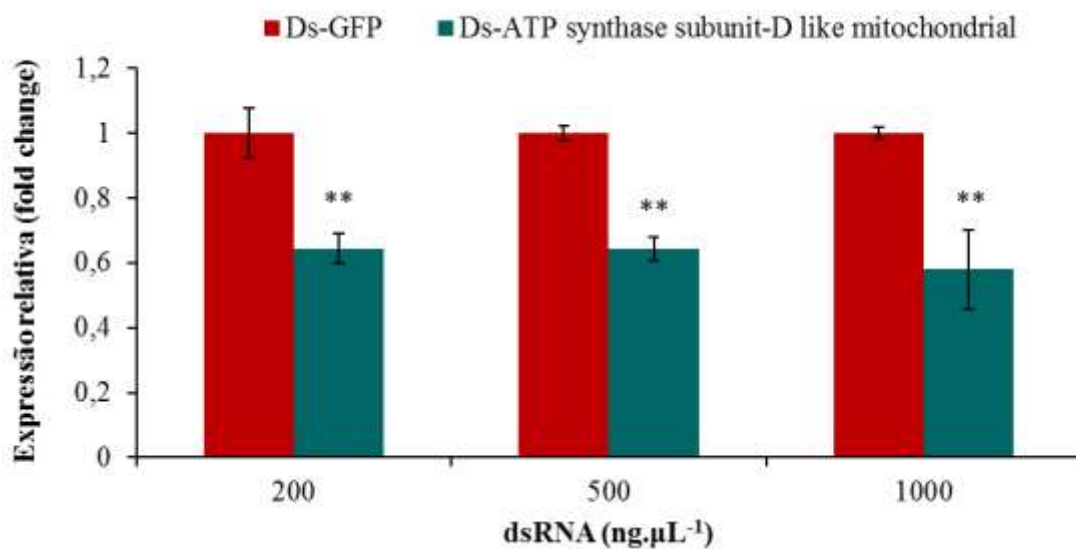
**Figura 22.** Nível de expressão do gene *inhibitor of apoptosis* de *D. citri* após ingestão de dsRNAs deste gene nas concentrações 200, 500 e 1000 ng.µL<sup>-1</sup> por 120 h. \* indica diferença estatística em relação ao dsRNA de GFP (p<0.05); \*\* diferença estatística em relação ao dsRNA de GFP (P<0.01).

Nos tratamentos com dsRNAs para o gene *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase-A* houve redução de 13, 16 e 31 % na expressão do gene alvo nas concentrações 200, 500 e 1000 ng.µL<sup>-1</sup>, respectivamente (Fig. 23). E nos tratamentos com dsRNAs *ATP synthase subunit-D like mitochondrial* pode ser observado redução na expressão do gene deste gene de 36 e 39 % nas concentrações 200 e 500, respectivamente, e de 42 % a 1000 ng.µL<sup>-1</sup> de dsRNA (Fig. 24).





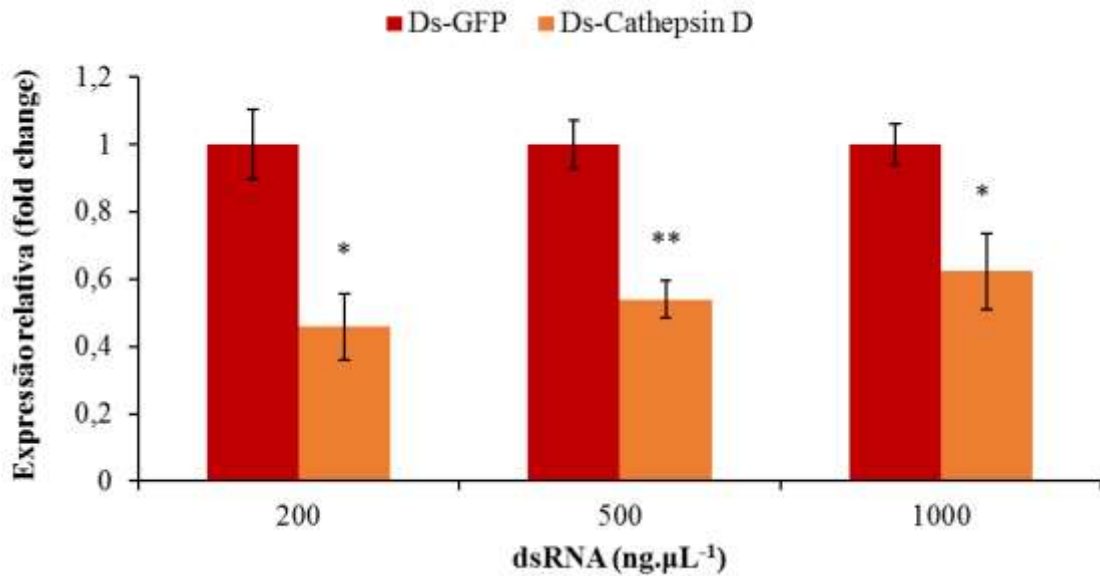
**Figura 23.** Nível de expressão do gene  $Na^+/K^+ ATPase-A$  de *D. citri* após ingestão de dsRNAs deste gene nas concentrações 200, 500 e 1000  $ng.\mu L^{-1}$  por 120 h. \*\*diferença estatística em relação ao dsRNA de GFP ( $P < 0.01$ ).



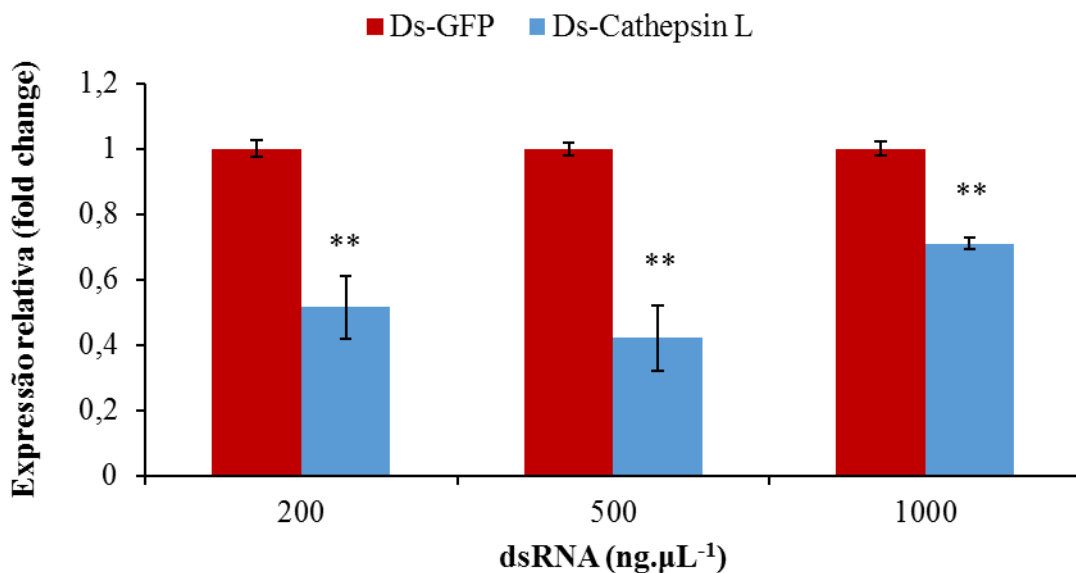
**Figura 24.** Nível de expressão do gene *ATP synthase subunit-D like mitochondrial* de *D. citri* após ingestão de dsRNAs deste gene nas concentrações 200, 500 e 1000  $ng.\mu L^{-1}$  por 120h. \*\*diferença estatística em relação ao dsRNA de GFP ( $P < 0.01$ ).

Nos tratamentos com dsRNAs *cathepsin D*, a expressão deste gene foi reduzida para 45, 53 e 62 % nas concentrações 200, 500, e 1000  $ng.\mu L^{-1}$ , respectivamente (Fig. 25), e

nos tratamentos com dsRNAs *cathepsin L*, a expressão do gene foi reduzida para 51, 42 e 71 % nas concentrações 200, 500 e 1000 ng.µL<sup>-1</sup>, respectivamente (Fig. 26).

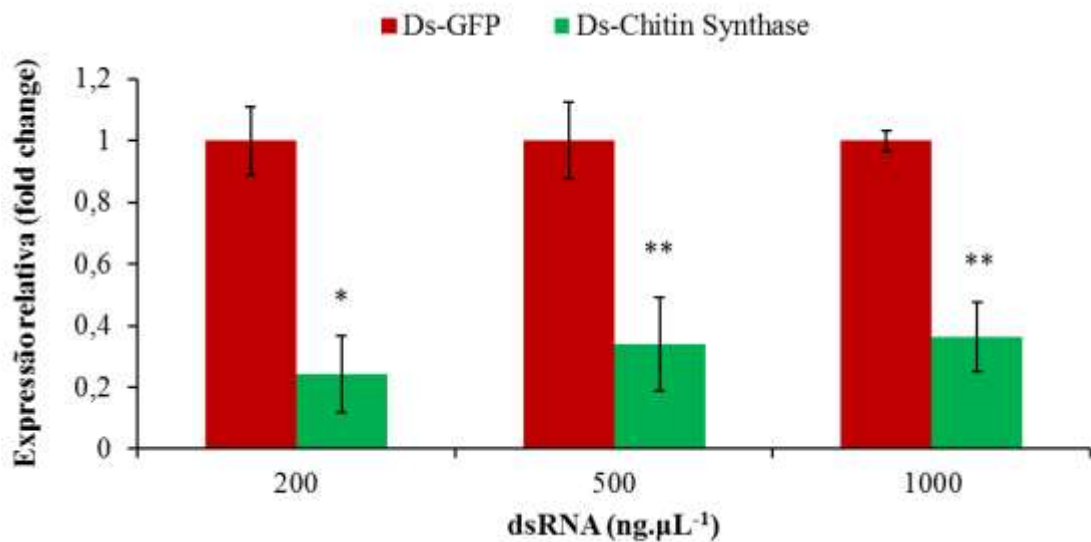


**Figura 25.** Nível de expressão do gene *cathepsin D* de *D. citri* após ingestão de dsRNAs deste gene nas concentrações 200, 500 e 1000 ng.µL<sup>-1</sup> por 120h. \*indica diferença estatística em relação ao dsRNA de GFP ( $p < 0.05$ ); \*\*diferença estatística em relação ao dsRNA de GFP ( $p < 0.01$ ).

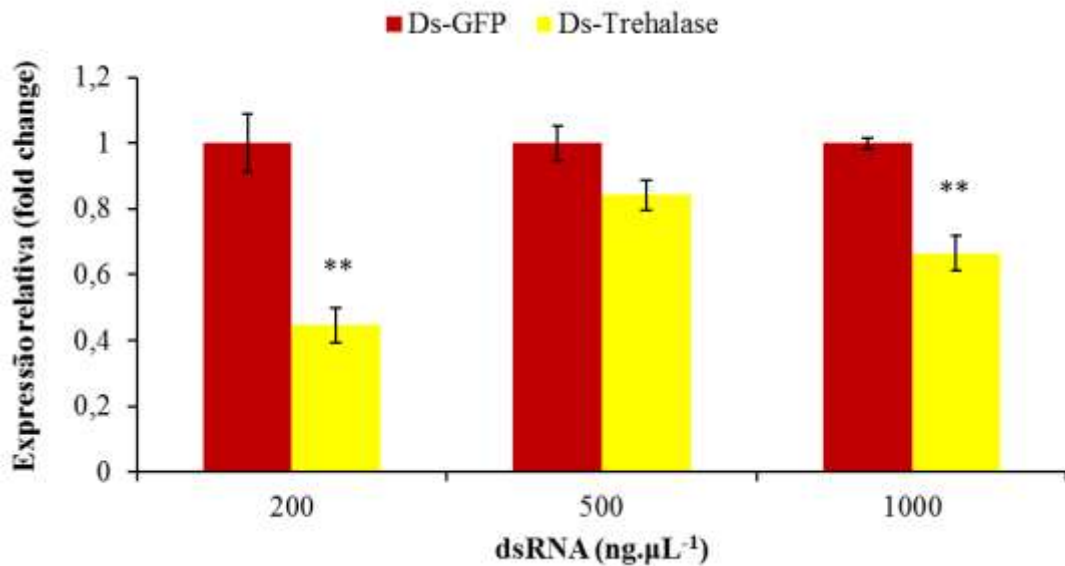


**Figura 26.** Nível de expressão do gene *cathepsin L* de *D. citri* após ingestão de dsRNAs deste gene nas concentrações 200, 500 e 1000 ng.µL<sup>-1</sup> por 120 h. \*\*diferença estatística em relação ao dsRNA de GFP ( $p < 0.01$ ).

Nos tratamentos com dsRNAs para o gene *chitin synthase* houve redução de 76, 66 e 64 % nas expressão gênica deste gene em *D. citri* nas concentrações 200, 500 e 1000 ng.μL<sup>-1</sup>, respectivamente (Fig. 27). E nos tratamentos com dsRNAs para o gene *trehalase*, houve redução de 56, 16 e 34 % de expressão gênica nas concentrações 200, 500 e 1000 ng.μL<sup>-1</sup>, respectivamente (Fig. 28).



**Figura 27.** Nível de expressão do gene *chitin synthase* de *D. citri* após ingestão de dsRNAs deste gene nas concentrações 200, 500 e 1000 ng.μL<sup>-1</sup> por 120 h. \* indica diferença estatística em relação ao dsRNA de GFP (p<0.05). \*\* diferença estatística em relação ao dsRNA de GFP (P<0.01).

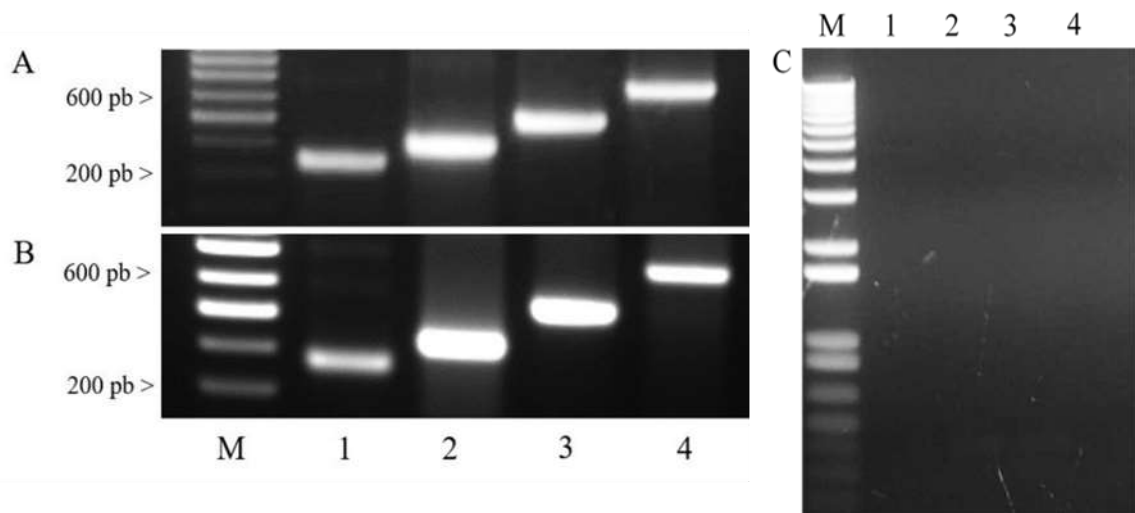


**Figura 28.** Nível de expressão do gene *trehalase* de *D. citri* após ingestão de dsRNAs deste gene nas concentrações 200, 500 e 1000 ng.µL<sup>-1</sup> por 120 h. \*\* diferença estatística em relação ao dsRNA de GFP (P<0.01).

### 5.7. Estabilidade de moléculas de dsRNAs em solução e nas folhas de *Murraya spp.*

Na busca de um sistema viável para entrega de dsRNAs para ninfas em ramos de murta, é importante observar a estabilidade dos dsRNAs tanto na solução em que os ramos da planta estão como também no tecido vegetal. Assim, a estabilidade dos dsRNAs dos genes *inhibitor of apoptosis*, *cathepsin D*, *chitin synthase* e GFP em solução e também nas folhas de murta foram avaliados para validação deste sistema. Os dsRNAs dos tratamentos foram utilizados na concentração 500 ng.µL<sup>-1</sup> e, após cinco dias dos ramos de murta em solução de dsRNAs, as moléculas puderam de dsRNAs puderam ser observadas em gel de agarose 2 % com brometo de etídeo (Fig. 29A).

Já para avaliar a presença de dsRNAs nos tecidos foliares de murta, após 11 dias dos ramos estarem em solução de dsRNAs, foi realizada a extração do RNA total das plantas e *primers* específicos para cada gene foram utilizados para detecção das moléculas de dsRNA que puderam ser observados em gel de agarose 2% com brometo de etídeo (Fig. 29B). Além disso, as moléculas de dsRNAs não foram detectadas nos ramos de murta que estavam em água destilada (Fig. 29C), demonstrando que os *primers* utilizados foram específicos para detectar os dsRNAs nos tecidos dos ramos da planta. Portanto, este sistema de entrega de dsRNAs para *D. citri* é viável para ser utilizado com intuito de avaliar os efeitos de RNAi no inseto.



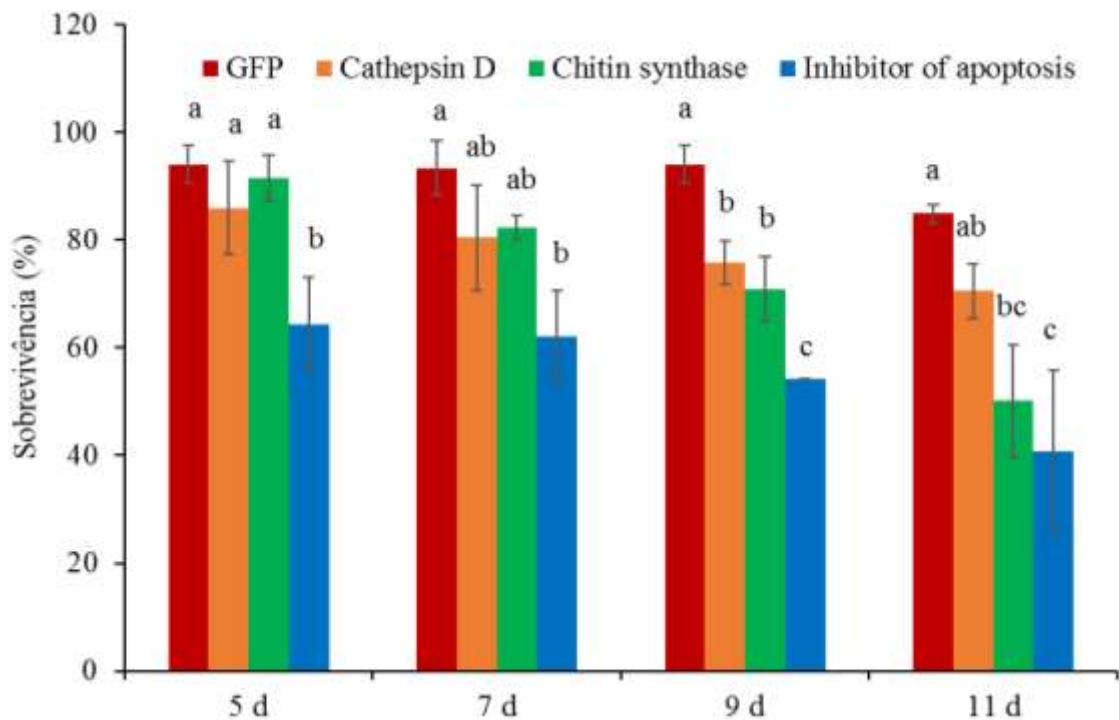
**Figura 29.** Amplificação de fragmentos de dsRNAs em solução e folhas de murta. A: Estabilidade de dsRNAs de *cathepsin D*, *chitin synthase*, *inhibitor of apoptosis* e GFP em soluções onde estavam os brotos de murta. B: Amplificação de moléculas de dsRNAs por RT-PCR em folhas de murta após 11 dias em solução de dsRNAs. C: Amplificação de moléculas de dsRNAs em folhas de murta após 11 dias em água destilada sem dsRNAs. 1: GFP; 2: *cathepsin D* dsRNA; 3: *chitin synthase* dsRNA; 4: *Inhibitor of apoptosis* dsRNA. M: Marcador molecular (100 pb)

### 5.8. Avaliação da sobrevivência de ninfas de *D. citri* em ramos de *Murraya spp.*

Para avaliar os efeitos de dsRNAs nos estágios juvenis de *D. citri*, ramos de murta contendo ovos de *D. citri* foram colocados em água destilada e soluções de dsRNAs GFP, *inhibitor of apoptosis*, *cathepsin D* e *chitin synthase* na concentração  $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . A partir do quinto dia foram realizadas as avaliações da taxa de sobrevivência de ninfas, pois a partir deste momento todos os ovos viáveis já estavam eclodidos. Assim as avaliações ocorreram nos 5º, 7º, 9º e 11º dias após colocar os ramos nas soluções de cada tratamento.

Após 11 dias, a sobrevivência das ninfas nos ramos de murta em apenas água destilada foi de 72 % (dados não mostrados), demonstrando a eficiência do sistema de alimentação. Assim, as médias experimentais foram corrigidas pela divisão da sobrevivência das ninfas observada para cada tratamento dsRNA pela sobrevivência de ninfas obtida no controle da água destilada. O tratamento com moléculas de dsRNA do gene *cathepsin D* reduziu a sobrevivência das ninfas de 86 para 71 % entre o 5º e 11º dia, e somente no 7º dia ocorreu diferença significativa quando comparado com o GFP dsRNA (Figura 30). Além disso, dsRNA de *chitin synthase* reduziu a sobrevivência das ninfas, significativamente, em relação ao

controle dsRNA GFP, que era de 79 % no 7º dia de avaliação para 50 % no último dia. Também foi observado que no 5º dia do ensaio, ninfas morreram rapidamente quando se alimentaram nos ramos de murta em solução de dsRNA do gene *inhibitor of apoptosis*, reduzindo a sobrevivência dos insetos para 64 %, chegando a 40 % no 11º dia de avaliação. Nos três dias avaliados, este tratamento foi significativo em relação ao tratamento dsRNA GFP. Estes resultados demonstraram dsRNA *inhibitor of apoptosis* foi o mais letal para ninfas de *D. citri*.

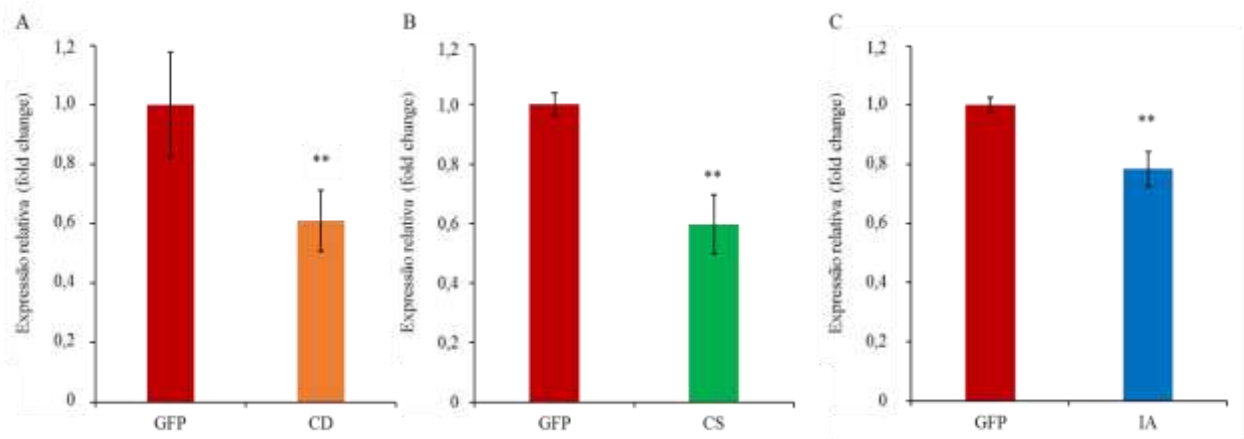


**Figura 30.** Taxa de sobrevivência de ninfas de *D. citri* durante 11 dias em sistema de silenciamento gênico em ramos de murta contendo dsRNAs na concentração 500 ng.µL<sup>-1</sup>. Diferenças estatísticas entre os tratamentos no mesmo tempo avaliado estão demonstradas com diferentes letras (P<0,01). GFP; CD: *Cathepsin D*; IA: *Inhibitor of apoptosis*; CS: *Chitin synthase*.

### 5.9. Avaliação da expressão de genes de *D. citri* após ingestão de dsRNAs em ramos de murta

Para avaliar se moléculas de dsRNAs ingeridas por ninfas via ramos de murta induziram efeitos de RNAi em *D. citri*, foi realizada a quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real para avaliar os níveis de RNA mensageiro dos genes alvo do inseto. Ninfas foram coletadas no 11º dia do bioensaio de alimentação em ramos de murta na concentração 500 ng.µL<sup>-1</sup> de dsRNAs. Estas análises revelaram que em todos os tratamentos houve redução

significativa na expressão gênica dos genes alvos em comparação com o tratamento com dsRNAs GFP. Os tratamentos de dsRNAs dos genes *inhibitor of apoptosis*, *cathepsin D* e *chitin synthase* reduziram a expressão dos genes alvos para 78, 60 e 59 %, respectivamente (Fig. 31).



**Figura 31.** Níveis de expressão dos genes alvos de ninfas de *D. citri* após ingestão de dsRNAs via ramos de murta em concentrações  $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  por 120 h. A: Níveis de expressão do gene *cathepsin D*; B: Níveis de expressão do gene *chitin synthase*; C: Níveis de expressão do gene *inhibitor of apoptosis*. \*\*diferença estatística em relação ao dsRNA de GFP ( $P < 0.01$ ). CD: *cathepsin D*; CS: *Chitin synthase*; IA: *Inhibitor of apoptosis*.

## 6. DISCUSSÃO

Estudos para avaliar os efeitos de RNAi na expressão de genes essenciais aos insetos oferecem grandes avanços para a entomologia, especialmente para analisar as funções de genes, estabelecer estratégias de controle de pragas e reduzir as doenças causadas por patógenos que são transmitidos por insetos vetores. Um sistema de fornecimento adequado de moléculas de dsRNAs pode ser uma grande limitação nos estudos de RNAi para insetos (OTTI; MAGGHE, 2007; SCOTT et al., 2013; TERENIUS et al., 2011; YU et al., 2013; ZHANG; LI; MIAO, 2013a). Diversos métodos de fornecimento de dsRNAs tem sido demonstrados para insetos sugadores de seiva, como cigarrinhas, pulgões, mosca branca e psilídeos (EL-SHESHENY et al., 2013; HUVENNE; SMAGGHE, 2010; KHAN et al., 2013; LI et al., 2014; UPADHYAY et al., 2011; WURIYANGHAN; FALK, 2013; WURIYANGHAN; ROSA; FALK, 2011). Portanto, estabelecer um sistema de alimentação por dieta artificial que seja viável para insetos sugadores propicia realizar diferentes ensaios, por exemplo, avaliar a transmissão de agentes patogênicos, manipulação da microbiota, efeitos de inseticidas e efeitos de moléculas de dsRNAs em insetos.

Assim, a primeira etapa do estudo foi definir qual a concentração ideal de sacarose a ser utilizada como dieta artificial para *D. citri*, para posterior fornecimento de dsRNAs por meio deste método. Primeiramente, foram avaliadas quatro diferentes concentrações de sacarose: 10, 20, 30 e 40%, no sistema de dieta artificial para insetos adultos de *D. citri* e pôde ser constatado que as melhores concentrações foram 20 e 30 %. Na tentativa de otimizar a dieta artificial, foram utilizadas as concentrações 20, 25 e 30 % de sacarose para os insetos adultos, sendo que a concentração que se mostrou mais promissora foi a dieta artificial contendo 30% de sacarose, pois 70 % dos insetos estavam vivos após cinco dias. Para confirmar a ingestão de dieta artificial por *D. citri*, foi realizado o método de coloração com safranina de bainhas estiletas presentes nas membranas de Parafilm<sup>®</sup> que compunham o sistema de alimentação e pode ser observado a presença de bainhas estiletas nos tratamentos com dietas artificiais compostas por sacarose. Insetos sugadores que se hospedam em plantas produzem dois tipos de saliva: a gelatinosa ou bainha salivar, que tem como funções dar suporte ao estilete, prevenir a entrada de ar nos vasos e saída de líquido das células, além de proteger contra substâncias de defesa da planta, e, a outra aquosa que ajuda na digestão de tecidos vegetais e reage contra proteínas de defesa de plantas (TJALLINGII, 2006). Hall et al. (2010), obtiveram resultados semelhantes onde conseguiram 72 % de sobrevivência de insetos adultos de *D. citri* em dieta artificial de sacarose 30 % após sete dias de avaliação.

Psilídeos, bem como os seus parentes afídeos, possuem a capacidade de crescer em dietas com elevadas pressões osmóticas sob a forma de concentrações elevadas de sacarose (ASHFORD; SMITH; DOUGLAS, 2000). Bactérias endossimbiontes presentes nestes insetos fornecem aminoácidos essenciais, porém não elimina o requerimento de nitrogênio na forma de aminoácidos não essenciais (DOUGLAS; MINTO; WILKINSON, 2001), necessários para a síntese de proteínas e crescimento (RUSSELL; PELZ-STELINSKI, 2013). Além disso, a capacidade de lidar com diferentes níveis de tensão osmótica foi investigada em afídeos e foi demonstrado o aumento na atividade da sacarase em resposta ao aumento de concentrações de sacarose. Acredita-se que esta enzima em pulgões seja responsável pela digestão de sacarose em frutose e glicose, os quais podem ser transportados através do inseto ou convertidos em oligossacarídeos pela sacarase. Estas reações enzimáticas e etapas de transporte diminuem o potencial osmótico da seiva do floema e auxilia o pulgão a tolerar o estresse osmótico (KARLEY et al., 2005).

Entretanto, notou-se que populações de *D. citri* estabelecidas no Laboratório de Biotecnologia exibiram um comportamento diferente das populações estabelecidas na Universidade da Califórnia, Davis, afinal a maior taxa de sobrevivência destes insetos foi em



dieta contendo sacarose 15% e não 30 % como havia sido registrado no Brasil na primeira etapa deste trabalho, demonstrando assim que populações distintas da mesma espécie de inseto podem apresentar respostas diferentes em dieta artificial. Uma explicação para este fato é que a diversidade genética de *D. citri* no mundo, baseada nas sequências de DNA do citocromo oxidase I, sugere a existência de oito haplótipos (BOYKIN et al., 2012). O haplótipo 1 ocorre nos EUA (Flórida e Texas), Índia, Árabia Saudita, Brasil e México; haplótipo 2 inclui populações do Brasil (São Paulo), China (Fuzhou, Gangzhou), Indonésia (Java, Bali), Taiwan (Taipei), Tailândia (Hat Yai) e do Vietnã (Hanoi); haplótipo 3 inclui populações de Porto Rico e Guadalupe; haplótipos 4-8 inclui populações de China (Gangzhou, Zhejaing), Flórida e México (Akil, Yucatan) (LASHKARI et al., 2014). Também já foram relatadas diferenças morfológicas e na densidade de endossimbiontes entre populações de *D. citri* (CHU et al., 2016; LASHKARI; HENTZ; BOYKIN, 2015), além de diferenças na capacidade de vôo e resistência a inseticidas de *D. citri* relacionadas com a diversidade de coloração do abdômen dos insetos (MARTINI; HOYTE; STELINSKI, 2014; TIWARI et al., 2013).

Assim, o sistema de alimentação via dieta artificial contendo 15 % de sacarose e corante alimentício foi utilizada para fornecer moléculas de dsRNAs para a população de *D. citri* mantida na Universidade da Califórnia (Davis). O sistema foi bastante eficiente pois a taxa de mortalidade dos insetos no controle, dieta artificial contendo 15 % de sacarose, foi menor que 5 % após 120 h. Além disso, as moléculas de dsRNAs avaliadas no último dia do ensaio foram estáveis na solução de dieta artificial, demonstrando que esta abordagem pode ser útil para estudos de RNAi em *D. citri*. Resultados similares foram observados em dietas artificiais contendo V-ATPase dsRNAs para *B. dorsalis*, *N. lugens* (LI et al., 2011) e *B. cockerelli* (WURIYANGHAN; ROSA; FALK, 2011). No entanto, moléculas de dsRNAs presentes em dietas artificiais podem ser degradadas por nucleases presentes nas secreções salivares de alguns insetos. Por exemplo, dsRNAs de GFP foram degradados por pulgões que se alimentaram por 84 h em dieta artificial (CHRISTIAENS; SWEVERS; SMAGGHE, 2014a).

O sistema de dieta artificial utilizado no presente trabalho não foi eficaz para avaliar a sobrevivência de ninfas ocasionando a morte de 100 % dos insetos após 120 h. Recentemente, foi desenvolvido um sistema onde uma ninfa foi colocada em confinamento entre membranas de Parafilm<sup>®</sup> para se alimentar de dieta artificial contendo sacarose (0,5 M) e aminoácidos (150 mM) em papel filtro. O sistema foi eficaz para avaliar o desenvolvimento de ninfas de *D. citri* chegando ao estágio adulto nesta dieta artificial (RUSSELL; PELZ-STELINSKI, 2015), porém apresentou altas taxas de mortalidade dos insetos, demonstrando

assim a importância na elaboração de sistema de confinamento de insetos e escolha de compostos presentes em dieta artificial.

Com base nos estudos de fornecimento de moléculas de dsRNAs para mosca-branca via ramos de plantas de tomate (LUAN et al., 2013b), foi desenvolvido um sistema de entrega de dsRNAs para ninfas de *D. citri* a partir de ramos de *Murraya* spp. Esta metodologia se mostrou viável por 11 dias de avaliação dos bioensaios, pois pôde-se detectar as moléculas de dsRNAs tanto nas soluções onde estavam os ramos das plantas como também dentro dos tecidos vegetais, demonstrando o transporte destas moléculas por meio dos ramos. Portanto, estabelecer sistemas de alimentação por dieta artificial e/ou via ramos de plantas, que sejam viáveis para insetos sugadores, propiciam realizar diferentes ensaios, por exemplo, avaliar a transmissão de agentes patogênicos, manipulação da microbiota, efeitos de inseticidas e de moléculas de dsRNAs em insetos.

O primeiro relato de silenciamento gênico via RNAi em *D. citri* foi com a aplicação tópica de dsRNAs do gene *awd* (gene associado com desenvolvimento de asas de insetos) em ninfas de 5º instar. Além de promover altas taxas de mortalidade das ninfas, essa aplicação também provocou alterações morfológicas nas asas dos adultos, bem como diminuição da expressão gênica de *awd* (EL-SHESHENY et al., 2013). Estas alterações morfológicas e redução na expressão do gene *awd* também foram observadas em ninfas que se alimentaram de *Citrus macrophylla* expressando dsRNAs de *awd* a partir de um vetor de CTV (HAJERI et al., 2014). Além destes dois trabalhos, estudos indicaram que a aplicação tópica de dsRNAs de genes da família CYP450 em adultos propiciaram maior suscetibilidade a inseticidas, portanto podendo aliar as estratégias química e de RNAi como métodos de controle de *D. citri* (KILLINY et al., 2014).

Assim, além de estabelecer um método eficiente de fornecimento de dsRNAs para inseto, é extremamente importante a escolha dos genes candidatos a serem silenciados que possam causar alterações morfológicas ou letalidade (RAO et al., 2015). Então, com base em relatos de estudos de genoma e transcriptoma de *D. citri* (DA SILVA FERRARA et al., 2015; FISHER et al., 2014; HUNTER et al., 2009; TIWARI et al., 2011), foram selecionados 16 genes candidatos, e dentre estes, 7 foram utilizados para os estudos de RNAi em *D. citri*.

No presente trabalho, *D. citri* nos estágios adultos ou ninfas alimentadas com dsRNAs de *inhibitor of apoptosis* em dieta artificial e ramos de murta, demonstraram altas taxas de mortalidade após 5 e 11 dias de avaliação, respectivamente. Também pode ser observado a redução na expressão do gene alvo em insetos que se alimentaram das três concentrações avaliadas de dsRNAs em dieta artificial e também de

dsRNAs via ramos de murta. Este efeito de silenciamento do gene pode ser mais eficiente porque a função deste gene é regular a maquinaria de apoptose e diversos processos celulares, incluindo ubiquitinação, sinalização intracelular, homeostase e divisão celular (SRINIVASULA; ASHWELL, 2008a). Este efeito também foi relatado ao micro-injetarem moléculas de *inhibitor of apoptosis* dsRNA em ninfas e adultos de *Lygus lineolaris* e observaram que ambos demonstraram redução no tempo de vida quando comparados com indivíduos que não receberam dsRNA do gene alvo (WALKER; ALLEN, 2011). Também já foi observado o aumento na taxa de mortalidade em fêmeas de *Aedes aegypti* que receberam aplicação tópica de moléculas de dsRNAs, de três tamanhos diferentes do gene *inhibitor of apoptosis*, podendo ser uma estratégia no desenvolvimento de inseticida para controle de inseto vetor de doença de importância médica (PRIDGEON et al., 2008a)

A partir dos resultados descritos anteriormente, as três concentrações presentes nos tratamentos de dsRNAs de *cathepsin D* e *cathepsin L* em dieta artificial demonstraram o aumento da mortalidade dos insetos e redução na expressão destes dois genes ao longo dos cinco dias avaliados. Da mesma maneira, a sobrevivência de ninfas de *D. citri* que se alimentaram de dsRNAs de *cathepsin D* via planta foi reduzida ao longo do tempo, assim como a redução da expressão do gene *cathepsin D* que foi avaliada no 11º dia do bioensaio. *Cathepsin L* e *cathepsin D* codificam proteases que estão envolvidas nos processos digestivo e de metamorfose em insetos, assim podendo ser alvos importantes de RNAi podendo alterar o aproveitamento de proteínas presentes na alimentação e também alterar o desenvolvimento (SAIKHEDKAR et al., 2015). Por exemplo, larvas de *B. mori* que foram injetadas com moléculas de *cathepsin D* dsRNAs demonstraram atraso na troca de estágios de desenvolvimento, de larva para pupa, sugerindo que este fato ocorreu por causa da redução na expressão deste gene inibindo a morte celular programa de células do tecido adiposo do inseto (GUI et al., 2006). Recentemente, já foi observado o efeito do silenciamento do gene *cathepsin L* em *Acyrtosiphon pisum* e *H. armigera*. No primeiro caso, ninfas de *A. pisum* foram injetadas com os dsRNAs exibiram alterações na morfologia corporal e muda, e ainda, dsRNAs fornecidas via alimentação artificial provocaram redução da expressão do gene *cathepsin L* no epitélio do intestino do inseto (SAPOUNTZIS et al., 2014). E no segundo caso, larvas de *H. armigera* foram alimentadas com dieta artificial contendo moléculas de dsRNAs, resultando redução na expressão do gene *cathepsin L* e retardo no crescimento e desenvolvimento dos insetos (CHIKATE et al., 2016).

Já os tratamentos onde insetos adultos e ninfas de *D. citri* alimentaram-se de moléculas de *chitin synthase* dsRNAs em dieta artificial e ramos de murta, respectivamente,

apresentaram mortalidade e redução na expressão do gene *chitin synthase* nos insetos e as diferenças em relação aos tratamentos na presença de GFP dsRNAs foram significativas. Muitos estudos têm demonstrado o silenciamento deste gene em insetos, por exemplo, fornecimento de dsRNAs de *chitin synthase* via injeção e alimentação causou atraso no desenvolvimento e letalidade em *S. exigua*. Além disso, cochonilhas dos citros, *Planococcus citri*, quando submetidas à alimentação em plantas de tabaco agro-infiltradas com o dsRNAs de *chitin sintase* ou *V-ATPase*, apresentaram altas taxas de mortalidade e diminuição da expressão do RNAm correspondente aos genes *chitin synthase A* e *V-ATPase* (KHAN et al., 2013). Também já foram relatados a redução nos níveis de quitina no intestino médio de *D. virgifera virgifera* após microinjeção de dsRNAs de *chitin synthase B* e diminuição da alimentação realizada por larvas de *H. armigera* em plantas de tabaco expressando dsRNAs de *chitin synthase*, resultando em perda de peso líquido das larvas e atraso no desenvolvimento (ALVES et al., 2010; QI et al., 2015).

Os resultados obtidos nos ensaios de alimentação em dieta artificial contendo concentrações diferentes de dsRNAs de *ATP synthase-D mitochondrial-like* e *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-A* demonstraram maiores taxas de mortalidade nos insetos de *D. citri* em comparação aos insetos que se alimentaram de dsRNAs de GFP, além do mais, a expressão do gene *ATP synthase-D mitochondrial-like* foi reduzido nas três concentrações utilizadas de dsRNAs deste gene. Porém a expressão do gene *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-A* em *D. citri* teve diminuição significativa em relação ao controle apenas na maior concentração de dsRNA *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-A* utilizada. Resultados equivalentes foram relatados em ninfas de *D. citri* que receberam de maneira tópica moléculas de dsRNAs de genes da família CYP450 e pode ser observado que a redução da expressão dos genes alvos estavam correlacionadas com a aumento das concentrações de dsRNAs utilizadas (KILLINY et al., 2014).

Por outro lado, os tratamentos de dsRNAs de *trehalase* em dieta artificial resultaram menor mortalidade dos insetos nas concentrações 200 ng.µL<sup>-1</sup> e 1000 ng.µL<sup>-1</sup> quando comparadas nestas mesmas concentrações de dsRNAs dos outros seis genes avaliados, porém nestas duas condições houve redução da expressão genica do gene alvo. Resultados similares foram observados em ninfas de terceiro ínstar de *N. lugens* que se alimentaram de plantas transgênicas de arroz expressando diferentes dsRNAs (*NIHT1*, um transportador de hexose, *Nlcar*, carboxipeptidase e o *Nltry*, uma protease), a redução dos RNAm dos genes alvos variaram de 40 a 70 %. Entretanto, de acordo com os autores, não foi observada mortalidade nos insetos quando estes se alimentaram nas plantas transgênicas, mesmo estas demonstrando a produção de dsRNA e siRNA nos vasos do floema. Os autores sugerem que tais resultados

podem estar relacionados com a quantidade de dsRNA/siRNA absorvida pelos insetos, ou os genes estudados podem pertencer à uma família multigênica, na qual outros membros podem compensar a supressão de um membro (ZHA et al., 2011). Outro fato importante foi observado em larvas de *N. lugens* micro-injetadas com dsRNAs de *trehalase 1* e *2*, onde foi constatado que ambos os genes têm um efeito compensatório, isto é, quando a expressão de um dos genes reduz, a do outro é aumentada e a taxa de mortalidade dos insetos foi de 14% a 31% (ZHAO et al., 2016). Entretanto, micro-injeções de moléculas de dsRNAs destes mesmos genes em *S. exigua* causou alta taxa de mortalidade durante os estágios de larva-pupa e pupa-adulto, e também constataram que o silenciamento dos genes *trehalase 1* e *2* reduziram a expressão dos genes *chitin synthase A* e *B*, respectivamente (CHEN et al., 2010b).

A dose necessária de indutores de RNAi para causar alterações fenotípicas e mortalidade em insetos varia com a espécie do inseto, fase da vida, abundância da transcrição do gene alvo e seus perfis de expressão espacial e temporal, e também de acordo com a escolha do método de fornecimento (SCOTT et al., 2013). Os resultados apresentados nos bioensaios de alimentação de dsRNAs em dieta artificial de *D. citri* demonstram claramente a correlação positiva entre as concentrações de dsRNA e mortalidade para todos os genes-alvo testados. No entanto, não houve correlação entre dosagens de dsRNAs com os níveis de expressão de cada gene alvo. Possivelmente, as concentrações elevadas dsRNAs estão relacionados com efeitos de toxicidade dsRNAs em *D. citri*, induzindo a um aumento da mortalidade no psíldeo gerada por efeitos “*off-targets*” ou saturação da via de RNAi (NUNES et al., 2013a; WURIYANGHAN; FALK, 2013). Resultados semelhantes foram relatados em *B. tabaci* e *H. armigera* mostrando nenhuma correlação óbvia do aumento das concentrações de dsRNA com o grau de silenciamento dos genes alvos (LI et al., 2014; TERENIUS et al., 2011).

Portanto, o desenvolvimento de técnicas viáveis de fornecimento de moléculas de dsRNAs para *D. citri* fornece um ponto de partida para avaliar a função de genes que possam ser utilizados para o controle do inseto vetor de bactérias causadoras de HLB, assim como já foi demonstrado em estudos anteriores (EL-SHESHENY et al., 2013; HAJERI et al., 2014; KILLINY et al., 2014). Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a aquisição oral de dsRNAs de genes alvos de *D. citri* via dieta artificial e ramos de murta causam letalidade nos diferentes estágios de desenvolvimento do inseto. Isto é importante e apoia a possibilidade do uso do RNAi como estratégia de controle do inseto vetor, resultando na diminuição da doença em citros.

## 7. CONCLUSÕES

A escolha de um método de fornecimento de dsRNAs para insetos é o primeiro passo para avaliar os efeitos de RNAi nestes organismos. Pode-se constatar que dietas artificiais compostas por sacarose 15 e 30% são eficazes para manter os insetos adultos de *D. citri* vivos em sistema de alimentação *in vitro*, durante cinco dias, e que estão estabelecidos no Centro de Citricultura e na UC Davis, respectivamente.

A ingestão de dieta artificial contendo diferentes concentrações de dsRNAs *ATP synthase subunit-D like mitochondrial*, *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase-A*, *cathepsin D*, *cathepsin L*, *chitin synthase*, *inhibitor of apoptosis* e *trehalase* resultou na diminuição da expressão dos genes alvos e aumento nas taxas de mortalidade em insetos adultos de *D. citri*, e, dentre esses genes analisados, os tratamentos de dsRNAs de *cathepsin D*, *chitin synthase* e *inhibitor of apoptosis* causaram maior letalidade nos insetos. Além disso, ingestão de dsRNAs de *cathepsin D*, *chitin synthase* e *inhibitor of apoptosis* sistema via ramos de murta resultou em diminuições nas taxas de sobrevivência e expressão dos genes alvos de ninfas de *D. citri*. Também, em ambos os sistemas de fornecimento de dsRNAs, dieta artificial e ramos de murta, as moléculas de dsRNAs foram estáveis.

## 8. REFERÊNCIAS

- AGUILAR-, C. I.; JUNIOR, J. P.; GIROTTO, L. F. Fitopatologia Morte Súbita Dos Citros : Uma Nova Doença Na Citricultura Brasileira. 1999.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K. D. Candidatus Liberibacter asiaticus and Huanglongbing Effects on Citrus Seeds and Seedlings. v. 44, n. 7, p. 1967–1973, 2009.
- ALBRECHT, U.; FIEHN, O.; BOWMAN, K. D. Metabolic variations in different citrus rootstock cultivars associated with different responses to Huanglongbing. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 107, p. 33–44, 2016.
- ALVES, A. P. et al. RNA interference as a method for target-site screening in the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. **Journal of insect science (Online)**, v. 10, n. 162, p. 162, jan. 2010.
- AMDAM, G. V. et al. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. **BMC Biotechnology**, v. 3, p. 1–8, 2003.
- AMMAR, A. E. et al. Detection and Relative Titer of Candidatus Liberibacter asiaticus in the Salivary Glands and Alimentary Canal of *Diaphorina citri* ( Hemiptera : Psyllidae ) Vector of Citrus Huanglongbing Disease Detection and Relative Titer of Candidatus Liberibacter asia.

- Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, n. 3, p. 526–533, 2011.
- AMMAR, E.-D.; SHATTERS, R. G.; HALL, D. G. Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Associated with Citrus Huanglongbing Disease, in its Psyllid Vector using Fluorescence in situ Hybridization. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 11-12, p. 726–734, 25 dez. 2011.
- ANDREW, F.; CRAIG, M. The discovery of RNA interference. **Karolinska Institute**, p. 1–10, 2006.
- ARAKANE, Y. et al. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 32, p. 11337–42, 9 ago. 2005.
- ASHFORD, D. A.; SMITH, W. A.; DOUGLAS, A. E. Living on a high sugar diet: The fate of sucrose ingested by a phloem- feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 3, p. 335–341, 2000.
- BANSAL, R.; MICHEL, A. P. Core RNAi machinery and Sid1, a component for systemic RNAi, in the hemipteran insect, *Aphis glycines*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3786–3801, 2013.
- BARRAZA, A.; SÁNCHEZ, F. Trehalases: a neglected carbon metabolism regulator? **Plant signaling & behavior**, v. 8, n. 7, p. e24778, 2013.
- BASSANEZI, R. B. et al. Damages caused by huanglongbing on sweet orange yield and quality in São Paulo. **Proc. of the Huanglongbing-Greening**, 2006.
- BASSANEZI, R. B. et al. Epidemiologia do huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 11–23, 2010.
- BAUM, J. A et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1322–6, nov. 2007.
- BAUM, J. A.; ROBERTS, J. K. **Progress Towards RNAi-Mediated Insect Pest Management**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2014. v. 47
- BAUTISTA, M. A. M. et al. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 38–46, 2009.
- BELASQUE JÚNIOR, J. et al. Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 387–393, 2005.
- BELLÉS, X. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. **Annual review of entomology**, v. 55, p. 111–28, jan. 2010.
- BOAVA, L. P. et al. Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids

- under infection of *Phytophthora parasitica*. **BMC genomics**, v. 12, n. 39, p. 1–13, 2011.
- BOLOGNESI, R. et al. Characterizing the Mechanism of Action of Double-Stranded RNA Activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). **Plos One**, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2012.
- BOVÉ, J. .; GARNIER, M. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. **Plant Science**, v. 163, n. 6, p. 1083–1098, dez. 2002.
- BOVE, J. M. et al. HUANGLONGBING: A DESTRUCTIVE , NEWLY-EMERGING , CENTURY · OLD DISEASE OF CITRUS. v. 88, p. 7–37, 2006.
- BOVE, J. M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 7–37, 2006.
- BOVÉ, J. M. I Nvited R Eview Huanglongbing : a Destructive , Newly-Emerging ., v. 88, p. 7–37, 2006.
- BOWN, D. P.; GATEHOUSE, J. A. Characterization of a digestive carboxypeptidase from the insect pest corn earworm (*Helicoverpa armigera*) with novel specificity towards C-terminal glutamate residues. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 10, p. 2000–2011, 2004.
- BOYKIN, L. M. et al. Overview of worldwide diversity of *Diaphorina citri* Kuwayama mitochondrial cytochrome oxidase 1 haplotypes: two Old World lineages and a New World invasion. **Bulletin of entomological research**, p. 1–10, 17 abr. 2012.
- BROWN, S. et al. ATP synthase is responsible for maintaining mitochondrial membrane potential in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 1, p. 45–53, 2006.
- BROWN, S. J. et al. Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. **Evolution & development**, v. 1, n. 1, p. 11–5, 1999.
- BUCHER, G.; SCHOLTEN, J. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). **Current Biology**, v. 12, n. 3, p. 85–86, 2002.
- BURAND, J. P.; HUNTER, W. B. RNAi: Future in insect management. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, n. SUPPL.1, p. S68–S74, 2013.
- CAPALDI, R. A.; AGGELER, R. Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor. **Trends Biochem Sci**, v. 27, n. 3, p. 154–160, 2002.
- 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**. (D. of A. Sciences, Ed.) Proceedings of the 6th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. **Anais...**1974
- CHEN, J. et al. Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Insect Molecular Biology**, v. 19, n. 6, p. 777–786,



2010a.

CHEN, J. et al. Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by RNA interference. **PLoS one**, v. 5, n. 4, p. e10133, jan. 2010b.

CHEN, X. et al. Bulletin of Entomological Research Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. **Bulletin of Entomological Research**, v. 98, p. 613–619, 2008.

CHIKATE, Y. R. et al. RNAi of selected candidate genes interrupts growth and development of *Helicoverpa armigera*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2016.

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, 2014a.

CHRISTIAENS, O.; SWEVERS, L.; SMAGGHE, G. Peptides 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, 2014b.

CHU, C. C. et al. Inter-Population Variability of Endosymbiont Densities in the Asian Citrus Psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). **Microbial Ecology**, v. 71, n. 4, p. 999–1007, 2016.

CHU, C.-C. et al. Differential effects of RNAi treatments on field populations of the western corn rootworm. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 110, p. 1–6, 2014.

COLETTA-FILHO, H. D. et al. First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, n. 12, p. 1382, 2004.

COY, M. R. et al. Phenol-oxidizing laccases from the termite gut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 10, p. 723–732, 2010.

CZECH, B.; HANNON, G. J. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. **Nat. Rev. Genet**, v. 12, p. 19–31, 2011.

DA GRAÇA, J. V. et al. Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world’s citrus. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, n. 4, p. 373–387, 2016.

DA SILVA FERRARA, T. F. et al. Characterization of a recombinant cathepsin B-like cysteine peptidase from *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae): A putative target for control of citrus huanglongbing. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, 2015.

DALMAY, T. et al. SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. **EMBO Journal**, v. 20, n. 8, p. 2069–2077, 2001.

- DONG, Y.; FRIEDRICH, M. Nymphal RNAi: systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper. **BMC biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 25, 2005.
- DOUGLAS, A. E.; MINTO, L. B.; WILKINSON, T. L. Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid. **The Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. Pt 2, p. 349–358, 2001.
- ELBASHIR, S. M. et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. **EMBO Journal**, v. 20, n. 23, p. 6877–6888, 2001.
- ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. **Genes and Development**, v. 15, n. 2, p. 188–200, 2001.
- ELLINGTON, W. R. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. **Annu. Rev. Physiol**, v. 63, p. 289–325, 2001.
- 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, n. 5, p. e65392, jan. 2013.
- FACEY, C. O.; LOCKSHIN, R. A. The execution phase of autophagy associated PCD during insect metamorphosis. **Apoptosis**, v. 15, p. 639–652, 2010.
- FEYEREISEN, R. Evolution of insect P450. **Biochem Soc Trans** 34:, v. 34, p. 1252–1255, 2006.
- FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998a.
- FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. February, p. 806–811, 1998b.
- FISHER, T. W. et al. Comparison of Potato and Asian Citrus Psyllid Adult and Nymph Transcriptomes Identified Vector Transcripts with Potential Involvement in Circulative, Propagative Liberibacter Transmission. p. 875–907, 2014.
- FREITAS-ASTÚA, J. et al. Differentially expressed stress-related genes in the compatible citrus-Citrus leprosis virus interaction. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3 SUPPL., p. 980–990, 2007.
- FRUITS, C. FAO. **FAO**, 2015.
- GARNIER, M.; BOVÉ, J. **Citrus Greening Disease and the Greening Bacterium Proceedings of 12th Conference IOCV, IOCV, Riverside**, 1993.
- GRAÇA, J. V. DA. CITRUS GREENING DISEASE. **Annual review of phytopathology**, v. 29, p. 109–136, 1991.
- GRAFTON-CARDWELL, E. E.; STELINSKI, L. L.; STANSLY, P. A. **Biology and**

- management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. **Annual review of entomology**, v. 58, p. 413–32, jan. 2013.
- GRINDSTAFF, K. K.; BLANCO, G.; MERCER, R. W. Translational regulation of Na, K-ATPase alpha1 and beta1 polypeptide expression in epithelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 23211–23221, 1996.
- GUI, Z. Z. et al. Functional role of aspartic proteinase cathepsin D in insect metamorphosis. **BMC developmental biology**, v. 6, n. 1, p. 49, 2006.
- HAJERI, S. et al. 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, n. 1, p. 42–49, 2014.
- HALBERT, S. E.; NÚÑEZ, C. A. Distribution of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina Citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean Basin. **Florida Entomologist**, v. 87, n. 3, p. 401–402, 2004.
- HALBERT, S. S. E. S.; MANJUNATH, K. 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, n. 3, p. 330–353, 2004.
- HALL, D. G. et al. Research Toward an Artificial Diet for Adult Asian Citrus Psyllid. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 103, n. 4, p. 611–617, 1 jul. 2010.
- HALL, D. G. et al. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 146, n. 2, p. 207–223, 2013.
- HALL, D. G.; SHATTERS, R. G.; CARPENTER, J. E. Research Toward an Artificial Diet for Adult Asian Citrus Psyllid. 2010.
- HAMMOND, S. M. et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **Nature**, v. 404, n. 6775, p. 293–296, 2000.
- HIJAZ, F.; EL-SHESHENY, I.; KILLINY, N. Herbivory by the insect *diaphorina citri* Induces greater change in citrus plant volatile profile than does infection by the bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant signaling & behavior**, v. 8, n. 10, p. 1–10, 11 jul. 2013.
- HIJAZ, F.; KILLINY, N. Collection and chemical composition of phloem sap from *Citrus sinensis* L. Osbeck (sweet orange). **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–11, 2014.
- HODDLE, M. S.; PANDEY, R. Host range testing of *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) sourced from the Punjab of Pakistan for classical biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae: Euphyllurinae: Diaphorinini) in California. **Journal of economic entomology**, v. 107, n. 1, p. 125–36, fev. 2014.
- HOUSEMAN, J. O. N. G.; DOWNE, A. E. R. Cathepsin d-like activity in the posterior midgut

- of hemipteran insects. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 75, n. 3, p. 509–512, 1983.
- HOY, M. A.; SINGH, R.; ROGERS, M. E. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian Citrus Psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: psyllidae). **Florida Entomologist**, v. 93, n. March, p. 24–32, 2010a.
- HOY, M. A.; SINGH, R.; ROGERS, M. E. Evaluations of a Novel Isolate of *Isaria fumosorosea* for Control of the Asian Citrus Psyllid , *Diaphorina citri* ( Hemiptera : Psyllidae ). v. 93, n. 1, p. 24–32, 2010b.
- HU, J.; XIA, Y. F<sub>1</sub>-ATP synthase  $\alpha$  subunit: a potential target for RNAi-mediated pest management of *Locusta migratoria manilensis*. **Pest Management Science**, n. October, p. n/a–n/a, 2015.
- HUGHES, C. L.; KAUFMAN, T. C. RNAi analysis of Deformed, proboscipedia and Sex combs reduced in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: novel roles for Hox genes in the hemipteran head. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 17, p. 3683–3694, 2000.
- HUNTER, W. B. et al. Psyllid Biology : Expressed Genes in Adult Asian Citrus Psyllids , *Diaphorina citri* Kuwayama. p. 18–29, 2009.
- HUTVÁGNER, G.; ZAMORE, P. D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. **Science (New York, N.Y.)**, v. 297, n. 5589, p. 2056–60, 2002.
- HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. **Journal of insect physiology**, v. 56, n. 3, p. 227–35, mar. 2010.
- IBGE. **IBGE**.
- IBGE. Indicadores IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE**, p. 14–49, 2016.
- IFTIKHAR, Y. et al. Huanglongbing: Pathogen detection system for integrated disease management – A review. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, n. May, p. 0–10, 2014.
- INOUE, H. et al. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology**, v. 155, n. 1, p. 29–36, ago. 2009.
- IRLES, P.; SILVA-TORRES, F. A.; PIULACHS, M. D. RNAi reveals the key role of *Nervana 1* in cockroach oogenesis and embryo development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 2, p. 178–188, 2013.
- JAROSCH, A. et al. RNA interference in honeybees : off-target effects caused by dsRNA

- Original article RNA interference in honeybees : off-target effects caused by dsRNA. **Apidologie**, v. 43, n. 2, p. 128–138, 2012.
- JAUBERT-POSSAMAI, S. . et al. Gene knockdown by RNAi pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. . **BMC Biotechnology**, v. 7, p. 63, 2007.
- JEFFERIES, K. C. .; CIPRIANO, D. J. .; FORGAC, M. Function, structure and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, p. 33–42, 2008.
- JIN, S. et al. Engineered chloroplast dsRNA silences cytochrome p450 monooxygenase, V-ATPase and chitin synthase genes in the insect gut and disrupts *Helicoverpa armigera* larval development and pupation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 3, p. 435–446, 2015.
- JING, Y.; ZHAO-JUN, H. A. N. Efficiency of Different Methods for dsRNA delivery in Cotton Bollworm (*Helicoverpa armigera*). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, n. 1, p. 115–123, 2014.
- JORGE JA, POLIZELI ML, THEVELEIN JM, T. H. Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. **FEMS Microbiol Lett**, v. FEMS Micro, p. 165–171, 1997.
- JR., J. B. et al. Controle do Huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 53–64, 2010.
- JUNIOR, J. B. et al. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing ( HLB , Greening ) visando o controle efetivo da doença. v. 34, p. 137–145, 2009.
- KAPLAN, J. . Biochemistry of Na, K-ATPase. **Annu. Rev. Biochem**, v. 71, p. 511–535, 2002.
- KARLEY, A. J. et al. The significance of gut sucrase activity for osmoregulation in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Journal of Insect Physiology**, v. 51, n. 12, p. 1313–1319, 2005.
- KATOCH, R. et al. RNAi for insect control: current perspective and future challenges. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 171, n. 4, p. 847–73, out. 2013.
- KENNERDELL, J. R.; CARTHEW, R. W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. **Cell**, v. 95, n. 7, p. 1017–26, 23 dez. 1998.
- KHAN, A. M. et al. Use of Recombinant Tobacco Mosaic Virus To Achieve RNA Interference in Plants against the Citrus Mealybug, *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae). **PLoS one**, v. 8, n. 9, p. e73657, jan. 2013.
- KILLINY, N. et al. Double-stranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five CYP4 genes and suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1–8, 2014.

- KIM, J.-S. et al. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” infection: microscopy and microarray analyses. **Phytopathology**, v. 99, n. 1, p. 50–7, jan. 2009.
- KOH, E. J. . et al. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 687–697, 2012.
- KUCHARSKI, R.; MALESZKA, R. Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honeybee, *Apis mellifera*. **Gene**, v. 211, p. 343–349, 1998.
- LARANJEIRA, F. F. et al. Prevalence, incidence and distribution of citrus variegated chlorosis in Bahia, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 5, p. 339–347, 2008.
- LASHKARI, M. et al. Global genetic variation in the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and the endosymbiont *Wolbachia*: links between Iran and the USA detected. **Pest Management Science**, v. 70, p. 1033–1040, 2014.
- LASHKARI, M.; HENTZ, M. G.; BOYKIN, L. M. Morphometric comparisons of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) populations from Iran, USA and Pakistan. **PeerJ**, v. 3, p. e946, 2015.
- LI, H. et al. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, n. 11, p. 2277–2285, 2015.
- LI, J. et al. RNA interference in *Nilaparvata lugens* ( Homoptera : Delphacidae ) based on dsRNA ingestion. **Pest Management Science**, n. January, p. 852–859, 2011.
- LI, J. et al. RNA interference of the P450 CYP6CM1 gene has different efficacy in B and Q biotypes of *Bemisia tabaci*. **Pest Management Science**, v. 71, n. February, p. 1175–1181, 2014.
- LI, X.; ZHANG, M.; ZHANG, H. RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011.
- LIN, Y. et al. Vitellogenin receptor mutation leads to the oogenesis mutant phenotype “scanty vitellin” of the silkworm, *bombyx mori*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 19, p. 13345–13355, 2013.
- LIU, S. et al. Gene knockdown by intro-thoracic injection of double-stranded RNA in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 40, n. 9, p. 666–71, set. 2010.
- 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, n. 3, p. 201–206, dez. 2000.
- LU, K. et al. Molecular characterization and RNA interference analysis of vitellogenin receptor from *Nilaparvata lugens*. **Journal of Insect Physiology**, v. 73, p. 20–29, 2015.

- LUAN, J. et al. Silencing the ecdysone synthesis and signaling pathway genes disrupts nymphal development in the white fly. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 8, p. 740–746, 2013a.
- LUAN, J. B. et al. Silencing the ecdysone synthesis and signaling pathway genes disrupts nymphal development in the whitefly. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 8, p. 740–746, 2013b.
- LUKASIEWICZ, K.; WĘGRZYN, G. Changes in genes coding for laccases 1 and 2 may contribute to deformation and reduction of wings in apollo butterfly (*Parnassius apollo*, Lepidoptera: Papilionidae) from the isolated population in Pieniny National Park (Poland). **ACTA ABP Biochimica Polonica**, v. 62, p. 1–4, 2015.
- MAFRA, V. et al. *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **BMC genomics**, v. 14, p. 247, jan. 2013.
- MANN, R. S. et al. Sexual transmission of a plant pathogenic bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, between conspecific insect vectors during mating. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e29197, jan. 2011.
- 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, n. 3, 2012.
- MAO, J. et al. Co-silence of the coatamer  $\beta$  and v-ATPase A genes by siRNA feeding reduces larval survival rate and weight gain of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 71–76, 2015.
- MAO, Y. B. et al. Cysteine protease enhances plant-mediated bollworm RNA interference. **Plant Molecular Biology**, v. 83, n. 1-2, p. 119–129, 2013.
- MAO, Y.-B. et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1307–1313, 2007.
- MAO, Y.-B. et al. Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. **Transgenic research**, v. 20, n. 3, p. 665–73, jun. 2011.
- MARTINI, X.; HOYTE, A.; STELINSKI, L. L. Abdominal Color of the Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Liviidae) Is Associated With Flight Capabilities. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 107, n. 4, p. 842–847, 2014.
- MEISTER G, T. T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, n. September, p. 343–349, 2004.
- MERZENDORFER, H. Insect chitin synthases: a review. **Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology**, v. 176, n. 1, p. 1–15, jan. 2006.

- MERZENDORFER, H.; ZIMMICH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **The Journal of experimental biology**, v. 206, p. 4393–4412, 2003.
- MEYERING-VOS, M.; MÜLLER, A. RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket *Gryllus bimaculatus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 8, p. 840–848, 2007.
- MICHAUD, J. P.; OLSEN, L. E. Suitability of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, as prey for ladybeetles. **BioControl**, v. 49, n. 4, p. 417–431, 2004.
- MITO, T. et al. The advent of RNA interference in Entomology. **Entomological Science**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 6 jan. 2011.
- MUNIZ, M. DE F. S.; QUEIROZ, F. M.; MENEZES, M. Caracterização de isolados de *Phytophthora* patogênicos a *Citrus sinensis* no Estado de Alagoas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 201–204, 2004.
- NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. **The Plant cell**, v. 2, n. 4, p. 279–289, 1990.
- NASCIMENTO, F. E. **Estudos sobre aquisição e concentração de “Candidatus Liberibacter asiaticus” e “Candidatus Liberibacter americanus” em *Diaphorina citri***. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.
- NAVA, D. E. et al. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, v. 131, n. 9-10, p. 709–715, dez. 2007.
- NEVES, M. F. O Retrato da Citricultura Brasileira. p. 138, 2010.
- NEWSHOLME E.A., BEIS I., L. A. R. & Z. V. A. The role of creatine kinase and arginine kinase in muscle. **Biochem. J.**, v. 172, p. 533–537, 1978.
- NIU, B. L. et al. Cloning and RNAi-mediated functional characterization of MaLac2 of the pine sawyer, *Monochamus alternatus*. **Insect Molecular Biology**, v. 17, n. 3, p. 303–312, 2008.
- NUNES, F. et al. Non-Target Effects of Green Fluorescent Protein (GFP)-Derived Double-Stranded RNA (dsRNA-GFP) Used in Honey Bee RNA Interference (RNAi) Assays. **Insects**, v. 4, n. 1, p. 90–103, 4 jan. 2013a.
- NUNES, F. M. F. et al. Non-Target Effects of Green Fluorescent Protein (GFP)-Derived Double-Stranded RNA (dsRNA-GFP) Used in Honey Bee RNA Interference (RNAi) Assays. **Insects**, v. 4, p. 90–103, 2013b.
- OTTI, M. J. Z.; MAGGHE, G. S. RNAi Technology for Insect Management and Protection of



- Beneficial Insects from Diseases : Lessons , Challenges and Risk Assessments. **Neotropical Entomology**, v. 44, n. 3, p. 197–213, 2007.
- PAIVA, P. E. B.; PARRA, J. R. P. Life Table Analysis of *Diaphorina citri* ( Hemiptera : Psyllidae ) Infesting Sweet Orange ( *Citrus sinensis* ) in São Paulo. **Florida Entomologist**, v. 95, n. 2, p. 278–284, 2012.
- PELZ-STELINSKI, A. K. S. et al. Transmission Parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera:Psyllidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 5, p. 1531–1541, 2010a.
- PELZ-STELINSKI, K. S. et al. Transmission Parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 5, p. 1531–1541, 1 out. 2010b.
- PRICE, D. R. G.; GATEHOUSE, J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 393–400, jul. 2008.
- PRIDGEON, J. W. et al. Topically applied AaeIAP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*. **Journal of medical entomology**, v. 45, n. 3, p. 414–420, 2008a.
- PRIDGEON, J. W. et al. Topically Applied AaeIAP1 Double-Stranded RNA Kills Female Adults of *Aedes aegypti* Topically Applied AaeIAP1 Double-Stranded RNA Kills Female Adults of *Aedes aegypti*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 3, p. 414–420, 2008b.
- PUGLISE, J. M.; ESTEP, A. S.; BECNEL, J. J. Expression profiles and RNAi silencing of inhibitor of apoptosis transcripts in *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 2, p. 304–314, 2016.
- QI, X.-L. et al. The effect of silencing arginine kinase by RNAi on the larval development of *Helicoverpa armigera*. **Bulletin of entomological research**, v. 105, n. 5, p. 555–565, 2015.
- QU, C. Eficácia de Inseticidas para o Manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama ( Hemiptera : Psyllidae ) em Citros. p. 1–9, 2009.
- RAO, K. V. . et al. Key enzymes and proteins of crop insects as candidate for RNAi based gene silencing. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. MAR, 2015.
- ROBERTO, J. et al. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao huanglongbing. 2004.
- RUSSELL, C. W.; PELZ-STELINSKI, K. S. Development of an artificial diet and feeding system for juvenile stages of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 154, n. 2, p. 171–176, 2015.
- SAA/SP. **Secretaria de Abastecimento do Estado de São Paulo**.
- SAIKHEDKAR, N. et al. Cathepsins of lepidopteran insects: Aspects and prospects. **Insect**

**Biochem Mol Biol**, v. 64, p. 51–59, 2015.

SANTOSH KUMAR UPADHYAY, K CHANDRASHEKAR, NIDHI THAKUR, PRAVEEN CHANDRA VERMA, J FRANCIS BORGIO, PRADHYUMNA KUMAR SINGH, R. T. RNA interference for the control of whiteflies ( *Bemisia tabaci* ) by oral route. **Journal of Bioscience**, v. 36, n. March, p. 153–161, 2011.

SAPOUNTZIS, P. et al. 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 Biochemistry and Molecular Biology**, v. 51, n. 1, p. 20–32, 2014.

SCOTT, J. G. et al. Towards the elements of successful insect RNAi. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, n. 12, p. 1212–1221, 2013.

SHU, Y. H. et al. The first vitellogenin receptor from a Lepidopteran. **Insect Molecular Biology**, v. 20, n. 1, p. 61–73, 2011.

SHUKLA, E. et al. Insect trehalase: Physiological significance and potential applications. **Glycobiology**, v. 25, n. 4, p. 357–367, 2015.

SIDYELYEVA, G.; BAKER, N. E.; FRICKER, L. D. Characterization of the molecular basis of the *Drosophila* mutations in carboxypeptidase D. Effect on enzyme activity and expression. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 19, p. 13844–52, 12 maio 2006.

SILVA, M. C. P. et al. Sequencing of *Spodoptera frugiperda* midgut trehalases and demonstration of secretion of soluble trehalase by midgut columnar cells. **Insect Molecular Biology**, v. 18, n. 6, p. 769–784, 2009.

SKELLEY, L. H.; HOY, M. A. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. **Biological Control**, v. 29, n. 1, p. 14–23, jan. 2004.

SRINIVASAN, A.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cell. Mol. Biol.**, v. 11, p. 132–154, 2006.

SRINIVASULA, S. M.; ASHWELL, J. D. IAPs: What's in a Name? **Molecular Cell**, v. 30, n. 2, p. 123–135, 2008a.

SRINIVASULA, S. M.; ASHWELL, J. D. Review IAPs : What ' s in a Name ? **Molecular Cell**, v. 30, p. 123–135, 2008b.

TABACHNICK, W. J. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) vector competence for the citrus greening pathogen “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 3, p. 839–848, 2015.

TERENIUS, O. et al. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **Journal of Insect Physiology**,

v. 57, n. 2, p. 231–245, 2011.

TIAN, H. et al. 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, p. e6225, 13 jul. 2009.

TIMMONS, L.; COURT, D. L.; FIRE, A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**, v. 263, n. 1-2, p. 103–112, 2001.

TIWARI, S. et al. Characterization of five CYP4 genes from Asian citrus psyllid and their expression levels in *Candidatus Liberibacter asiaticus*-infected and uninfected psyllids. **Insect molecular biology**, v. 20, n. 6, p. 733–44, dez. 2011.

TIWARI, S. et al. Abdominal color of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, is associated with susceptibility to various insecticides. **Pest management science**, v. 69, n. 4, p. 535–41, abr. 2013.

TJALLINGII, W. F. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 4, p. 739–745, 2006.

TOMARI, Y. A Protein Sensor for siRNA Asymmetry. **Science**, v. 306, n. 5700, p. 1377–1380, 2004.

TOMARI, Y.; ZAMORE, P. D. Perspective: Machines for RNAi. **Genes and Development**, v. 19, n. 5, p. 517–529, 2005.

TOMASETO, A. F.; KRUGNER, R.; LOPES, J. R. S. Effect of plant barriers and citrus leaf age on dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 140, n. 1-2, p. 91–102, 2016.

TUFAIL, M. et al. Regulation of vitellogenin genes in insects. **Entomological Science**, v. 17, n. 3, p. 269–282, 2014.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. **BBA Protein Struct. M.**, v. 1477, p. 98–111, 2000.

TURNER, C. T. et al. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 3, p. 383–391, 2006.

UPADHYAY, S. K. et al. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. **Journal of Biosciences**, v. 36, n. 1, p. 153–161, 29 abr. 2011.

UPADHYAY, S. K. et al. Molecular Characterization of Vitellogenin and Vitellogenin Receptor of *Bemisia tabaci*. **Plos One**, v. 11, n. 5, p. e0155306, 2016.

VAUX, D. L.; G. HAECKER, A.; STRASSER, A. An evolutionary perspective on apoptosis.

**Cell**, v. 76, p. 777–779, 1994.

WALKER, W. B.; ALLEN, M. L. RNA interference-mediated knockdown of IAP in *Lygus lineolaris* induces mortality in adult and pre-adult life stages. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 138, n. 2, p. 83–92, 30 fev. 2011.

WAN, P. J. et al. RNA interference depletion of the halloween gene *Disembodied* implies its potential application for management of planthopper *Sogatella furcifera* and *Laodelphax striatellus*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

WANG, G. H. et al. Cathepsin B protease is required for metamorphosis in silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Science**, v. 15, p. 201–208., 2008.

WANG, N.; TRIVEDI, P. Citrus huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. **Phytopathology**, v. 103, n. 7, p. 652–65, jul. 2013.

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**, v. 8, n. 6, p. e66050, jan. 2013.

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, n. 11, 2011.

XU, C. et al. **Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama** Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 1988.

YAMAMOTO, P.; ALVES, G.; BELOTI, V. Manejo e controle do huanglongbing (HLB) dos cítricos. **Investigación Agraria**, v. 16, n. 2, p. 69–82, 2015.

YAMAMOTO, P. T. et al. Efficacy of Insecticides for Managing *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. **BioAssay**, v. 4, p. 1–9, 2009a.

YAMAMOTO, P. T. . et al. Eficácia de Inseticidas para o Manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em Citros. **BioAssay**, v. 4, p. 1–9, 2009b.

YOKOI, K. et al. Sensitivity to RNA interference-mediated gene silencing in intact and ligated larvae of the armyworm, *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 48, n. 4, p. 431–439, 2013.

YOUNG, R. F.; SHIELDS, K. S.; BERLYN, G. P. Hemlock Woolly Adelgid (Homoptera: Adelgidae): Stylet Bundle Insertion and Feeding Sites. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 88, n. 6, p. 827–835, 1995.

YU, N. et al. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: An overview and future directions. **Insect Science**, v. 20, n. 1, p. 4–14, 2013.

- ZHA, W. et al. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e20504, jan. 2011.
- ZHANG Q, LU DH, PU J, WU M, H. Z. Cloning and RNA interference effects of trehalase genes in *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). **Acta Entomol Sin**, v. 55, p. 911–920, 2012.
- ZHANG, H.; LI, H. C.; MIAO, X. X. Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. **Insect Science**, v. 20, n. 1, p. 15–30, 2013a.
- ZHANG, H.; LI, H.-C.; MIAO, X.-X. Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. **Insect Science**, v. 20, n. 1, p. 15–30, 12 fev. 2013b.
- ZHAO, L. et al. Functional characterization of three trehalase genes regulating the chitin metabolism pathway in rice brown planthopper using RNA interference. n. February, p. 1–14, 2016.
- ZHAO, Y. I. et al. *Phyllotreta striolata* ( Coleoptera : Chrysomelidae ): Arginine kinase cloning and RNAi-based pest control. **Eur. J. Entomol.**, v. 105, p. 815–822, 2008.
- ZHU, K. Y. et al. Biosynthesis, Turnover, and Functions of Chitin in Insects. **Annual Review of Entomology**, v. 61, n. 1, p. 177–196, 2016.

## ANEXO I- Artigo em processo de publicação

### Oral delivery of double-stranded RNAs induces mortality in nymph and adult Asian Citrus Psyllids, *Diaphorina citri*

Diogo Manzano Galdeano<sup>1,2</sup>, Michèle Claire Breton<sup>1</sup>, João Roberto Spotti Lopes<sup>3</sup>, Bryce W. Falk<sup>4</sup>, Marcos Antonio Machado<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biotecnologia, Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Instituto Agrônomo de Campinas, Cordeirópolis, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup> Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup> Plant Pathology Department, University of California Davis, Davis, California, United States of America

\* Corresponding author:

E-mail: [marcos@centrodecitricultura.br](mailto:marcos@centrodecitricultura.br)

#### Abstract

The Asian citrus psyllid (ACP), *Diaphorina citri* Kuwayama, is one of the most important citrus pests. It is the vector of the phloem-limited bacteria *Candidatus Liberibacter americanus* and *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the causal agents of the devastating citrus disease, huanglongbing (HLB). The management of HLB is based on the use of healthy young plants, eradication of infected plants and chemical control of the vector. RNA interference (RNAi) has proven to be a promising tool to control pests as well as to explore gene functions. Recently, it has been reported that target mRNA knockdown in many insects can be induced through feeding with dsRNA. In the current study, we targeted *cathepsin D*, *chitin synthase* and *inhibitor of apoptosis* genes of adult and nymph ACP by artificial diets and *Murraya paniculata* leaves, respectively. Adult ACP mortality was positively correlated with the amount of dsRNA used. Both nymphs and adult ACP fed dsRNAs exhibited significantly increased mortality over time compared to controls.

Moreover, qRT-PCR analysis confirmed the dsRNA-mediated RNAi effects on target mRNAs. These results showed that RNAi can be a powerful tool for gene function studies in ACP and perhaps HLB control.

## Introduction

The Asian citrus psyllid (ACP), *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), is a phloem-feeding insect and the most economically important pest of citrus, mainly because it is the vector for the causal agents of huanglongbing (HLB), *Candidatus Liberibacter asiaticus* and *Candidatus Liberibacter americanus* [1,2]. HLB occurs throughout citrus-growing regions of Asia, Africa and America, and is the most significant disease affecting citrus worldwide, resulting in tree decline, reduced fruit quality and tree death [3–5]. Both ACP adults and nymphs can transmit the bacteria, and when it is acquired by nymphs the bacteria can be retained and transmitted after emergence of adults, suggesting that the pathogen multiplies and circulates in the ACP [6]. Moreover, the bacteria may be transmitted at low rates from infected females transovarially to their progeny [7] and from infected males to uninfected females during mating [8].

To control *D. citri* populations, citrus growers use several different insecticides [9]. However, the indiscriminate and continuous use of these insecticides can lead to pest resistance, which invariably leads to increased costs in production [10]. A main challenge for researchers has been to determine efficient strategies for *D. citri* control with low environmental impact, for example, the use the ectoparasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) [11], as natural predator [12], enthomopathogenics fungi [13] and recently, RNA interference (RNAi) [14–16].

RNAi is a powerful tool for studying functional genomics in eukaryotes and insects in particular [17]. The discovery of double-stranded RNA (dsRNA)-mediated gene-specific silencing in the nematode, *Caenorhabditis elegans* [18], enabled the dsRNA-mediated RNAi be employed towards various crop insects to silence specific genes [19].

The first step for successful RNAi in insects is to find a convenient and reliable method for delivery dsRNA to the target gene. Usually, microinjection, soaking, feeding and transgenic expression are adopted to deliver dsRNA into insects [20]. Successful target mRNA knockdown effects via artificial feeding of dsRNAs have been reported in crop pest insects including the potato/tomato psyllid (*Bactericerca cockerelli*), whiteflies

(*Bemisia tabaci*), western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*), pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*), cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*), oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*), lepidopteran (*Spodoptera exigua*), and the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) [21–30]. However, it is difficult to silence genes during the juvenile stages of some insects using this method, thus an efficient system was developed to silence genes of the whiteflies nymphs through leaf-mediated dsRNA feeding [31].

The next step for RNAi based insect control is identifying potential targets [32]. The enzyme cathepsin D is a lysosomal aspartic proteinase, located in the posterior midgut of Hemipterans, responsible for intracellular and extracellular protein digestion and also involved in metamorphic events of insects [33]. Injection of *cathepsin D* dsRNA into *Bombyx mori* larvae caused metamorphic defects, such as larval-pupal transformation arrest and programmed cell death inhibition [34]. Insect chitin synthases are the main enzymes for development of trachea, cuticle and midgut [35]. Chitin synthases are encoded by two genes, *chitin synthase A* and *B*. The gene expression of *Chitin synthase A* genes are expressed in tracheal, epidermal and ectodermal cells, , while *chitin synthase B* genes are expressed in gut epithelial cells involved in to produce the peritrophic matrix of insects midgut [36]. To demonstrate the RNAi effects in *S. exigua*, larvae fed *Escherichia coli* expressing *chitin synthase A* dsRNA showed that the growth and development were altered causing lethality [28]. Inhibitor of apoptosis proteins were first identified for their role in the regulation of apoptotic machinery. *Inhibitor of apoptosis* genes have also been identified in insects, yeast and mammals, and the have been observed the role in some process like intracellular signaling, ubiquitination, , homeostasis, cellular morphogenesis and cellular division [37]. dsRNA topically applied targeting an inhibitor of apoptosis protein gene in *Aedes aegypti* was able to kill these mosquitoes [38].

In the present study, we explored the RNAi effects in adult and nymph *D. citri* fed gene-specific dsRNAs, targeting *cathepsin D*, *chitin synthase* and *inhibitor of apoptosis*, on artificial diet and through plant leaves. We showed that both dsRNA delivery methods are efficient in silencing genes of ACP increasing the mortality rate over time and down-regulate of target genes.

## Materials and Methods

### Insects and plants



ACPs were reared in *Citrus macrophylla* in mesh cages maintained at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , under 14:10 (light:dark) photoperiod and 60-70% relative humidity (RH) at the Contained Research Facility (CRF) of the University of California, Davis (CA, USA; <http://crf.ucdavis.edu/>). Teneral adult ACPs and mated females were used for the feeding assays on artificial diet and in *Murraya paniculata* (L) Jack (Rutacea) leaflets, respectively.

### **RNA isolation and cDNA synthesis**

Total RNAs were isolated from a pool of ten live ACPs using ZR Tissue and Insect Microprep™ (Zymo Research®, catalog No. D6015) and the genomic DNA was removed from the samples by DNase I Set (Zymo Research®, catalog No. E1010) according to the manufacturer's protocol. The concentration and purity were determined using a NanoDrop ND 8000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). The cDNA synthesis was performed using iScript™ Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad®, catalog No. 170-8841), according manufacturer's protocol.

### **Identification, primers design and amplification of target genes**

To identify the *cathepsin D*, *chitin synthase* and *inhibitor of apoptosis* genes of ACP, the annotation of the *D. citri* transcriptome sequences was performed by screening the data bank Psyllid.org (<http://psyllid.org/download>) based on amino acid sequences of insects deposited in the NCBI (*Acyrtosiphon pisum*, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Apis florea*, *Apis mellifera*, *Bombus impatiens*, *Bombus terrestris*, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila pseudoobscura*) using BlastX. Primers were designed using the PrimerBlast tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Table 1). The PCR product corresponding to GFP sequence was amplified from plasmid pJL24. PCRs were performed using standard procedures (Sambrook, 2012) with GoTaq® DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, WI). The fragments were analyzed on 1% agarose gels containing SYBR® Safe DNA (Invitrogen®) 1%. The amplicon sequences were confirmed by sequencing.

Table 1. Primers and probes used in this study

Primer name	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Probe (5'-3')
<b>PCR</b>			
Cathepsin D	AAACAGACCTGGGAAACGCT	GCATCTTGTCCTCAAGTTGTCGC	
Chitin Synthase	AACTTTGGTCGAGACAAGCAG	TCCCAATAACCGCAGGAC	
Inhibitor of Apoptosis	TTTCGGTATCCTCGCAGATG	AGCTCTGCATGGTGTGGATG	
GFP	TACGGCGTGCAGTGCTTCA	CGTCCTCGATGTTGTGGCG	
<b>qRT-PCR</b>			
Cathepsin D	GCTAATGGACCTGCCAAAGT	TTTGTTCAGTGAAGGGTGAAG	TCGACGCTAGTCATCAGAGCTTCCA
Chitin Synthase	TCAGCATGGCGGGTTAAG	CTCCGCGGAATGACATGAATA	TGCCCTCGTGTCATTCTCAAGATCC
Inhibitor of Apoptosis	GGCTGAACTGTCTCCATTCTAT	GAACTCAGGTTCTGTGCTTCT	TGCTTGTTTACCTATCTGCCCACTCC
Actin	TGACATCAAGGAGAAGCTGTG	GTCGGGAAGTTCGTAGGATT	TCGCCCTGGACTTTGAACAGGAAA

### Double-stranded RNA preparation

The dsRNAs were synthesized *in vitro* with the MEGAscript RNAi kit (Ambion, catalog NO. AM1626), using target genes and GFP PCR products and both the forward and reverse primers containing the T7 promotor sequence (5' TAATACGACTCACTATAGGGAGA 3'). PCR to amplify sequences of *cathepsin D*, *chitin synthase*, *inhibitor of apoptosis* and GFP coding regions was performed using GoTaq® Colorless Flexi Buffer 5X (Promega), MgCl<sub>2</sub> 25 mM, dNTPs 10 mM, forward primer plus T7 promoter 10 µM, reverse primer plus T7 promoter 10 µM, GoTaq® DNA Polymerase 5 U/µL and 1 µL cDNA. The PCR products were purified according to the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, CA, USA).

*In vitro* transcription was performed using the DNA purified (1 µg), reaction Buffer 10X, ribonucleotide (ATP, GTP, CTP, UTP) and enzyme T7. The reaction was incubated at 37°C overnight. Contaminating genomic DNA was removed using TURBO DNA-free kit (Ambion, TX, USA). of the dsRNAs were precipitated by adding 30 µL lithium chloride precipitation solution (7.5 M lithium chloride, 50 mM EDTA) and 30 µL nuclease-free water. The samples were incubated for 1 h at -20°C and centrifuged at 4°C for 15 min at 16.000 g. The supernatant was removed and the pellets were washed once with 1 mL 70% ethanol. The ethanol was removed and the dsRNA was eluted in 20 µL

nuclease-free water. The dsRNA quality was monitored by agarose gel electrophoresis and the concentration was determined in Nanodrop.

### **Bioassays for feeding-based RNAi studies using artificial diets**

Teneral adult ACPs were allowed to feed on an artificial diet solution consisting of 15% (w:v) sucrose and food dyes (0.1% green and 0.4% yellow) (McCORMICK & CO). An aliquot of the artificial diet (100  $\mu$ l) was pipetted onto the parafilm and another layer stretched on top of the clear plastic vial (25 mm X 45 mm) to form a sachet and to ensure the liquid diet was distributed evenly. Feeding assays were performed at room temperature in photoperiod 14:10 (light:dark), 60-70% RH and the plastic vials were placed 1.20 m from the light source. For the mortality evaluations, *cathepsin D*, *chitin synthase* and *inhibitor of apoptosis* dsRNA concentrations (200, 500, 1000  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) were standardized and diluted in the artificial diet and used for feeding assays. Each replicate consisted of 30 individuals in 3 plastic vials (10 individuals in each vial), and three replicates were analyzed. GFP dsRNAs at the same concentrations in feeding solutions of 15% sucrose were used as controls for each experiment. After the teneral adult ACPs fed for 120 h, total RNAs were isolated from a pool of three adult ACPs and used for cDNA synthesis as describe above.

To test the stability of dsRNAs in the artificial diet solution 50  $\mu$ L of each solution were collected after the 5<sup>th</sup> day feeding. The artificial diet solutions were diluted in distilled water (1/10) and the dsRNAs were observed in 1% agarose gels.

### **Bioassays for feeding-based RNAi studies using *Murraya paniculata* leaflets**

A method previously describe to induce RNAi effects n whiteflies [31] was used to evaluate the RNAi effects on *D. citri* nymph survival with modifications. Briefly, one leaflet was cut off from *M. paniculata* plant and placed in 1.5 ml microtube containing distilled water for one day to recover. The microtube with the leaflet were transferred to Falcon flask (50 mL) and covered with a piece of anti-aphid mesh tightly held with a rubber band. One mated female adult *D. citri* was released onto the leaf through a hole in the middle of Falcon flask wall and was allowed to oviposit for 24 h and then removed. The leaflet was then transferred to a 1.5 mL microtube containing 0.5 ml of each dsRNA (*cathepsin D*, *chitin synthase*, *inhibitor of apoptosis* and GFP) at the concentration 500  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  or distilled water. The microtube with the leaflet were returned to the Falcon flask (50 mL) and covered as described above. The assays were performed at room temperature

in photoperiod 14:10 (light:dark), 60-70% RH and five replicates were used for each treatment. The solution in the microtube was replenished every four days and the percentage of nymph survival was counted at 5<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 9<sup>th</sup> and 11<sup>th</sup> days. After 11 days, total RNAs were isolated from a pool of three 3<sup>th</sup> instar nymphs and used for cDNA synthesis as describe above.

The stability of dsRNAs in the tubes and leaves were checked on the last day of the assay. dsRNAs from the tubes were collected at 11<sup>th</sup> day feeding assay described above. To detect the dsRNAs in leaves, a piece of leaf (0.05 g) collected and immediately frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated from leaf tissues. Primers for dsRNA synthesis along with the RNA samples were heated in boiled water for 5 min, and quenched on ice. Then the RNA was reverse transcribed and cDNA was used for RT-PCR [31]. Both the dsRNA solution from the tubes and PCR products of dsRNAs from plant leaf tissues were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels to examine the size and integrity of dsRNAs.

### **Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)**

The effect of dsRNAs on target mRNA levels was quantified by qRT-PCR using iTAQ<sup>TM</sup> Universal Probes Supermix (Bio-Rad<sup>®</sup>, catalog No. 172-5131). In order to avoid RT-PCR artifacts resulting from the input dsRNAs, primers and probes for qRT-PCR were designed to detect target mRNAs by amplifying sequences that lay outside of the input dsRNA sequences (Table 1). The design of the primers was carried out using *RealTime qPCR Assay* (<https://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>). *D. citri actin* gene was used as an internal control for normalization after validation. The reaction mixture contained 10 $\mu$ L iTAQ Universal Probes Supermix (2X), 0.18  $\mu$ L forward and reverse primers (5  $\mu$ M), 0.25  $\mu$ L fluorogenic probe of mRNA targets (1  $\mu$ M) and 0.25  $\mu$ L fluorogenic probe of *actin* mRNA (1  $\mu$ M), 6  $\mu$ L cDNA and nuclease-free water in a final reaction volume of 20  $\mu$ L. The standard amplification curves of *actin* and target mRNA were generated by diluting the amplified fragments as templates to verify the amplification efficiency of each primer set under the same amplification conditions. The amplification reactions were performed in the CFX96 Touch<sup>TM</sup> Real-Time PCR Dectection System (Bio-Rad<sup>®</sup>) and the reaction conditions were 3 min 95°C followed by 40 cycles of: 95°C for 10 s; 59°C for 30 s for annealing of primers and probes. GFP dsRNA was used as a control treatment.

Relative gene expression was evaluated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. The average value and standard error value (SE value) of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  value in treatment and control groups were calculated separately, and the statistical analyses were performed between these two groups. Reactions were set-up in 96-well Microseal PCR plates (Bio-Rad®) in triplicate.

### Statistical analysis

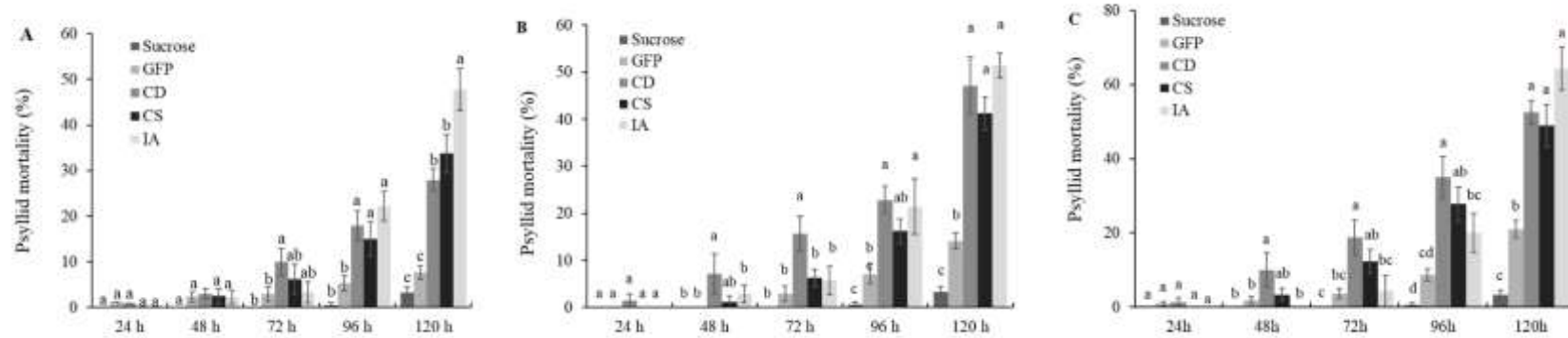
Experimental data from dsRNA feeding assays and target mRNA knockdown expression were evaluated using one-way ANOVA by Tukey's Test.

## Results

### ACPs mortality induced by dsRNAs on artificial diet

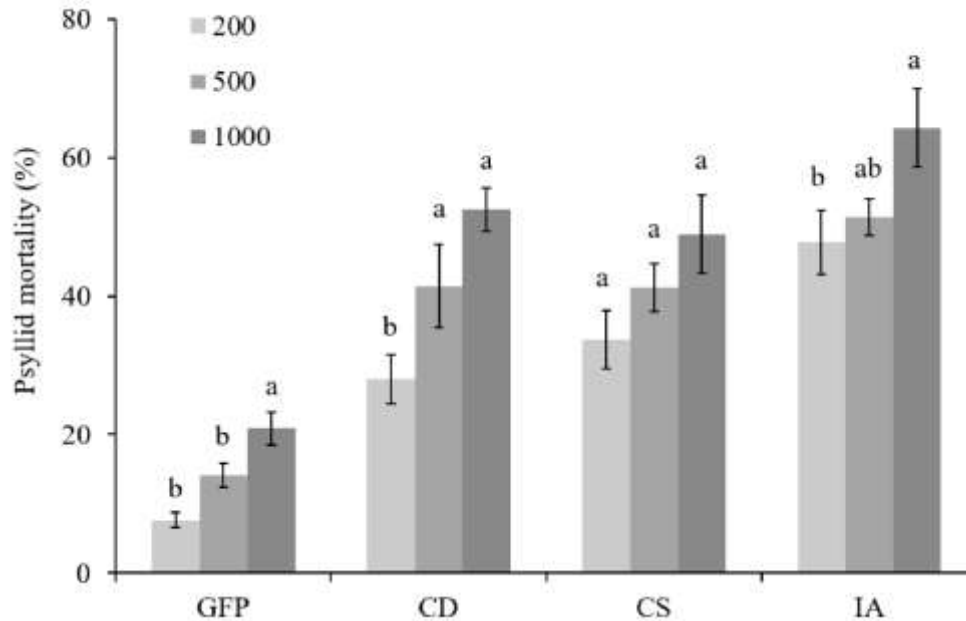
To determine the optimal concentration of dsRNA for ACP mortality, a series of dsRNA concentrations (200, 500 and 1000 ng. $\mu\text{L}^{-1}$ ) were tested for RNAi by feeding on artificial diet for five days. At the fifth day, ACP mortality was less than 5% when they were fed only with 15% sucrose, demonstrating the efficacy of the feeding system. All of the three target dsRNAs evaluated here showed significantly higher mortality than that observed for GFP dsRNA control for all concentrations tested. Moreover, the ACP mortality increased over time, reaching maximum values at 120 h post-treatment (Fig. 1A-C). The artificial diet containing the *inhibitor of apoptosis* dsRNA at 200 ng. $\mu\text{L}^{-1}$  resulted in 22% of ACP mortality after 96 h, and increased to 48% after 120 h. These percentages were significantly higher than those seen for GFP dsRNA control and for other dsRNAs. The concentration of 200 ng. $\mu\text{L}^{-1}$  of *cathepsin D* dsRNA caused 10, 18 and 28% of mortality after three, four and five days, respectively. Moreover, the mortality resulting from *chitin synthase* dsRNA was significantly greater than that for GFP dsRNA after 96 and 120 h in which showed 15 and 34%, respectively (Fig. 1A). At 120 h post-treatment, *inhibitor of apoptosis*, *cathepsin D* and *chitin synthase* dsRNA at 500 ng. $\mu\text{L}^{-1}$  gave 51, 47 and 41% of ACP mortality, respectively (Fig. 1B), moreover with 1000 ng. $\mu\text{L}^{-1}$ , the same resulted in 64, 52 and 49% of mortality, respectively (Fig. 1C). These results demonstrated that *inhibitor of apoptosis* dsRNAs induced the most potent ACP lethality among the three candidate dsRNAs examined in this study. Concentrations of the GFP dsRNA control (500 and 1000 ng. $\mu\text{L}^{-1}$ ) caused significantly higher mortality compared to the 15% sucrose control after 120 h (Fig. 1B-C). It is possible that high concentrations of dsRNAs

are able to initiate off-target or RNAi pathway saturation effects deleterious to ACPs [39–41].



**Figure 1. Mortality rate of psyllids allowed to feed on artificial diets.** Mortality rates by feeding 15% sucrose artificial diets containing dsRNAs of GFP, *cathepsin D*, *chitin synthase* and *inhibitor of apoptosis* at (A) 200 ng.µL<sup>-1</sup>, (B) 500 ng.µL<sup>-1</sup> and (C) 1000 ng.µL<sup>-1</sup> over time. Statistical differences are shown by different letters between different treatments at the same time points ( $P < 0.05$ ). CD: *cathepsin D* dsRNA; CS: *chitin synthase* dsRNA; IA: *inhibitor of apoptosis* dsRNA

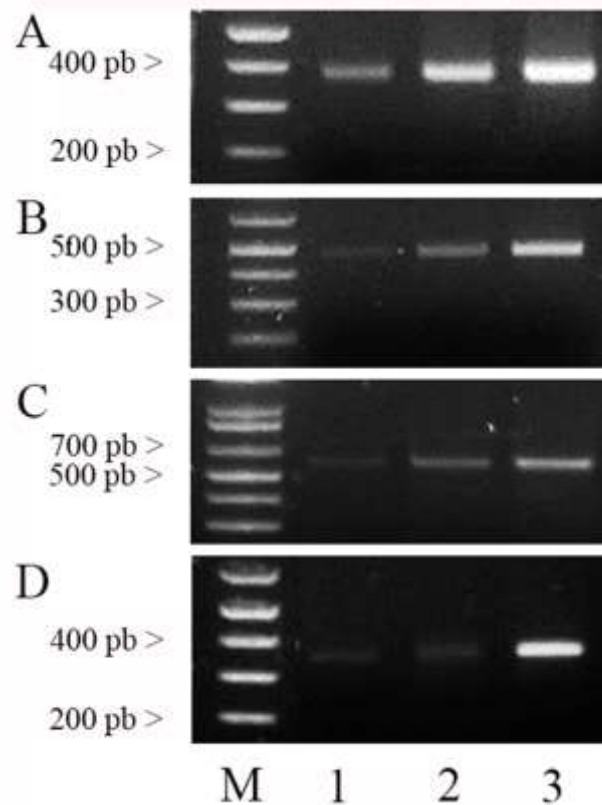
The mortality of *D. citri* showed a positive correlation with the concentrations of target genes and GFP dsRNAs treatments (Fig. 2). All of the test and GFP dsRNAs caused higher mortality at 1000 ng.μL<sup>-1</sup> than at lesser concentrations for each dsRNA tested.



**Figure 2. Dose responses in the mortality rate of psyllids allowed to feed on artificial diets containing dsRNAs.** Psyllid mortality induced by increasing concentrations 200, 500 and 1000 ng.μL<sup>-1</sup> of *cathepsin D*, *chitin synthase* and *inhibitor of apoptosis* and GFP dsRNAs after 120 h feeding assay. Statistical differences in psyllid mortality rates were evaluated between different concentrations of dsRNAs of each gene and GFP dsRNA after 120 h feeding assay ( $P < 0.05$ ). CD: *cathepsin D* dsRNA; CS: *chitin synthase* dsRNA; IA: *inhibitor of apoptosis* dsRNA.

After five days, the dsRNAs were detected from the 15% sucrose artificial diets showing the stability these molecules, what demonstrates that feeding dsRNAs via artificial diets is a good approach to select RNAi targets for *D. citri* (Fig. S1).

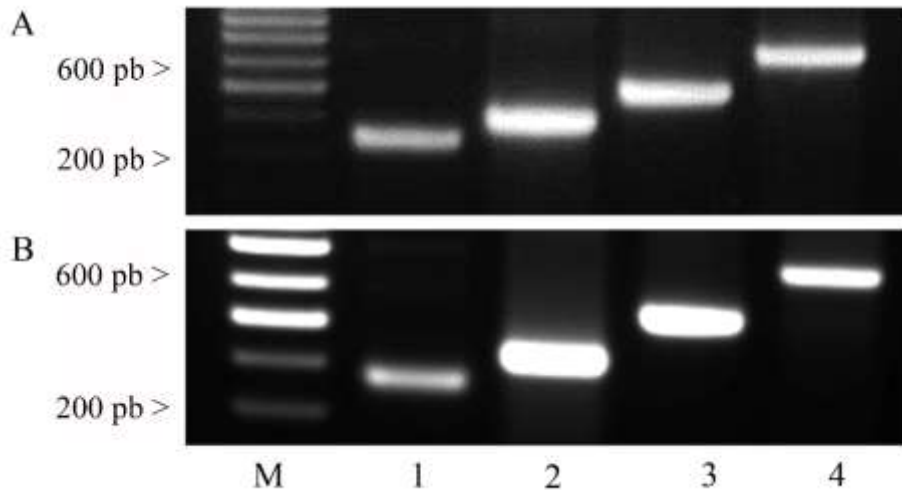




**Figure supplementary 1. Stability of target genes and GFP dsRNAs at different concentrations from artificial diet solutions after 5 days feeding assays.** A: *cathepsin D* dsRNA; B: *chitin synthase* dsRNA; C: *inhibitor of apoptosis* dsRNA; D: *GFP* dsRNA. M: ladder 100 bp; 1: 200 ng.µL<sup>-1</sup>; 2: 500 ng.µL<sup>-1</sup>; 3: 1000 ng.µL<sup>-1</sup>.

#### **Nymph survival rates induced by dsRNA uptake through *M. paniculata* leaves.**

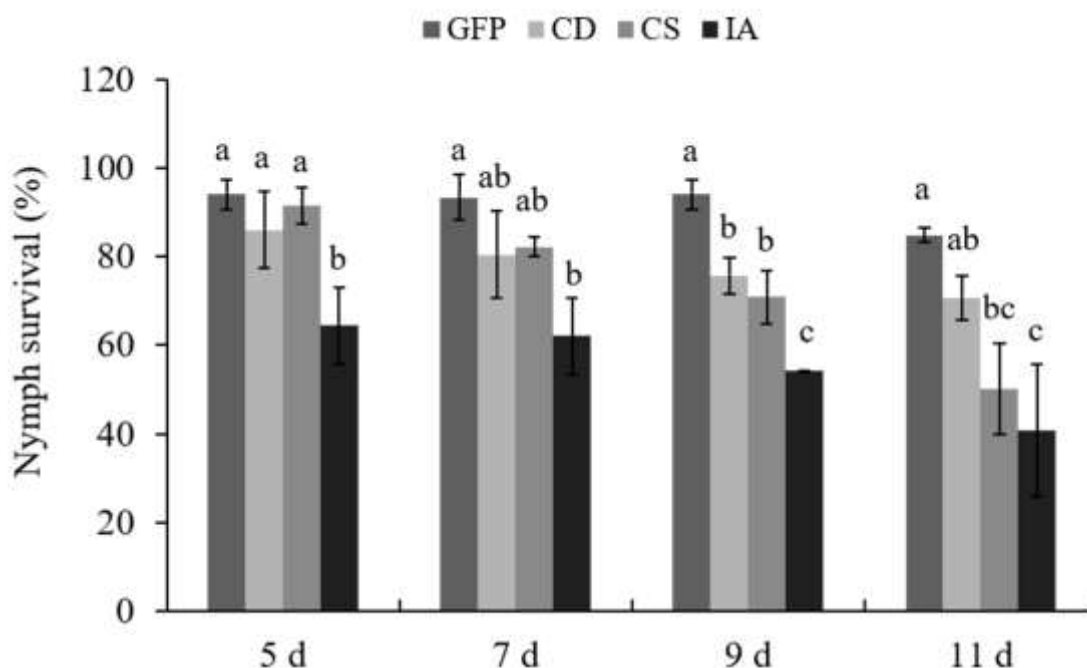
A method was developed to silence ACP genes by dsRNA feeding through plant leaflets. The uptake of the dsRNA by the *M. paniculata* leaflet and its stability in both the microtubes and the plant tissues was checked at the last day of the feeding assay. Results showed that all dsRNAs, *cathepsin D*, *chitin synthase* and *inhibitor of apoptosis*, and GFP were stable in the tubes (Fig. 3A) and in the leaves during the 11 days-long experiment (Fig. 3B). Hence, this approach of delivering dsRNAs via cut leaves was subsequently used to target mRNA knockdown to silence genes in *D. citri*.



**Figure 3. dsRNA stability in solutions and in plant leaves.** Stability of *cathepsin D*, *chitin synthase*, *inhibitor of apoptosis* and GFP dsRNAs from solutions where *M. paniculata* leaflets are soaked (A) and in leaves (B) at 11<sup>th</sup> day feeding assay were analyzed agarose gel electrophoresis. CD: *cathepsin D* dsRNA; CS: *chitin synthase* dsRNA; IA: *inhibitor of apoptosis* dsRNA.

The effect of *cathepsin D*, *chitin synthase* and *inhibitor of apoptosis* mRNA knockdown on ACP nymph survival was appraised by inserting detached *D. citri* egg-infested leaflets in a solution of dsRNA directed against each of three targets and the GFP control. *M. paniculata* leaflets containing *D. citri* eggs were placed in water, dsRNA solutions of each target and GFP at 500 ng.μL<sup>-1</sup>. Assessments of the nymph survival rate were carried out beginning at the 5<sup>th</sup> day because all viable eggs were already hatched. Thus the evaluations were in the 5<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 9<sup>th</sup> and 11<sup>th</sup> days after placing the leaflets in the dsRNA solutions. After 11 days, the nymph survival in leaflets in the water treatment was approximately 72% (data not shown), demonstrating the efficacy of the feeding system. Thus, the experimental averages were corrected by division of the nymph survival observed for each dsRNA treatment by nymph survival obtained in the water control. *Cathepsin D* dsRNA reduced the nymph survival from 86 to 71% between 5 and 11 days-long experiment and only at 7<sup>th</sup> day occurred difference when compared with the GFP dsRNA (Fig 4). Furthermore, *chitin synthase* dsRNA demonstrated significant reduction of 79 and 50% in the nymph survival at 7<sup>th</sup> and 11<sup>th</sup> days, respectively. Interestingly, nymphs rapidly died when fed of leaflets in *inhibitor of apoptosis* dsRNA solution at the 5<sup>th</sup> day, showing 64% survival and down to 40% after 11 days. These results demonstrate

that *inhibitor of apoptosis* dsRNA induces the most potent lethality in nymphs by feeding RNAi among the three candidate genes examined in this system.

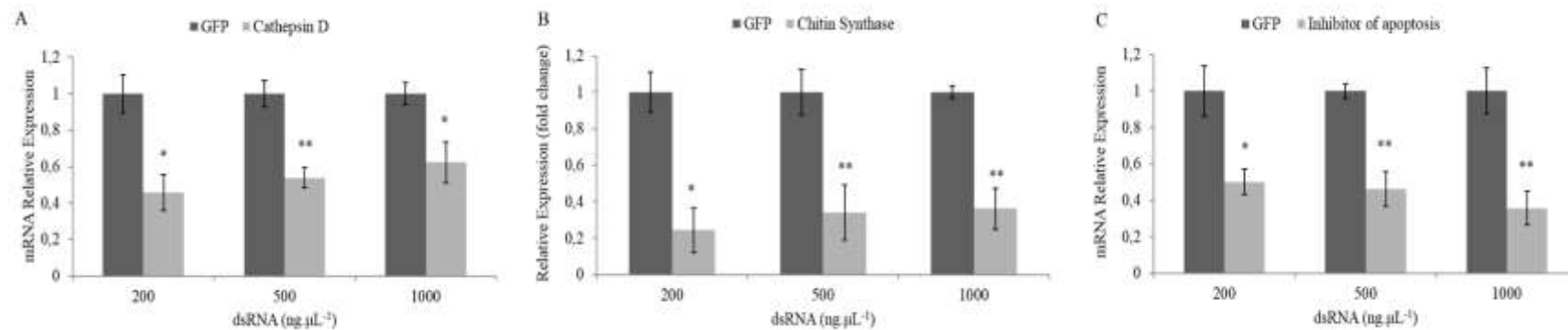


**Figure 4. Survival rate of *D. citri* nymphs allowed to feed dsRNAs through *M. paniculata* leaves.** Survival rate of *D. citri* nymphs by feeding of dsRNAs of GFP, *cathepsin D*, *chitin synthase* and *inhibitor of apoptosis* through *M. paniculata* leaves over time. Statistical differences are shown by different letters between different treatments at the same time points ( $P < 0.05$ ). CD: *cathepsin D* dsRNA; CS: *chitin synthase* dsRNA; IA: *inhibitor of apoptosis* dsRNA.

#### **Confirmation of target mRNA knockdown by dsRNA on artificial diet and *M. paniculata* leaves.**

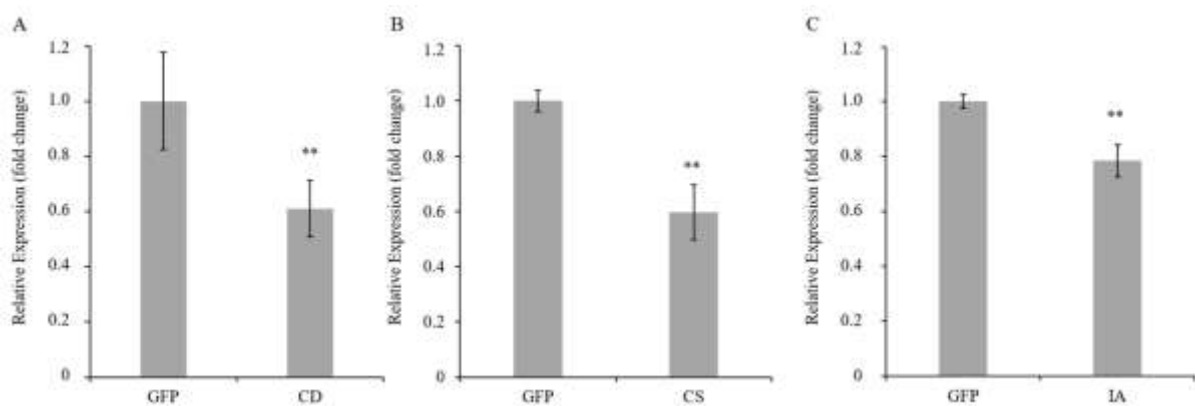
In order to determine if the dsRNAs acquired orally from artificial diets and through *M. paniculata* leaves induced target mRNA knockdown, quantitative real-time PCR was used to assess target mRNA levels in ACP. Teneral adults ACPs were collected 120 h after feeding on artificial diets at 200, 500 and 1000  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  dsRNAs, and total RNAs were extracted from live ACPs. After exposure to *cathepsin D* dsRNA for five days, the relative expression level of the target gene in *D. citri* was reduced to 46, 52 and 64% on 200, 500 and 1000  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  dsRNAs, respectively (Fig 5A). When ACPs were continuously fed with *chitin synthase* dsRNAs at 200, 500 and 1000  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , exhibited reduction of 76, 66 and 48% in mRNA level five days post feeding, respectively (Fig 5B).

Moreover, the mRNA levels of *inhibitor of apoptosis* of *D. citri* were reduced to 50, 46 and 36% on 200, 500 and 1000 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> dsRNAs, respectively (Fig 5C).



**Figure 5. Knockdown of endogenous psyllid mRNAs by dsRNA feeding on artificial diets after 120 h.** The dsRNAs were added to the artificial diets at concentrations of 200, 500 and 1000 ng.µL<sup>-1</sup> and total RNAs were isolated from live psyllids after 120 h feeding assays. GFP dsRNA-fed *D. citri* served as controls for each experiment. (A) Accumulation of *cathepsin D* mRNAs in whole psyllid after feeding on *cathepsin D* dsRNAs at 200, 500 and 1000 ng.µL<sup>-1</sup>. (B) Accumulation of *chitin synthase* mRNAs in whole psyllid after feeding on *chitin synthase* dsRNAs at 200, 500 and 1000 ng.µL<sup>-1</sup>. (C) Accumulation of *inhibitor of apoptosis* mRNAs in whole psyllid after feeding on *inhibitor of apoptosis* dsRNAs at 200, 500 and 1000 ng.µL<sup>-1</sup>. Statistical differences in relative expression were evaluated between test dsRNAs and GFP dsRNA at the same concentrations. Single asterisk indicates P<0.05 and double asterisks indicate P<0.01.

ACP third instar nymphs were collected 11 days after feeding dsRNAs of each gene through *M. paniculata* leaves and total RNAs were extracted from live nymphs. After nymphs fed for 11 days on dsRNAs via leaflets, the *cathepsin D*, *chitin synthase* and *inhibitor of apoptosis* expression levels were reduced to 61, 59 and 76%, respectively, and all genes were decreased significantly compared with the control (Fig 6A-C). These results described above demonstrate that feeding dsRNA via artificial diets and *M. paniculata* leaves caused target mRNA knockdown of *D. citri*.



**Figure 6 Knockdown of endogenous psyllid mRNAs by dsRNA feeding on *M. paniculata* leaves after 11 days.** *M. paniculata* leaflets were soaked in dsRNA solutions at concentrations of  $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  and total RNAs were isolated from live instar third nymphs after 11 days feeding assays. GFP dsRNA-fed *D. citri* served as controls for each experiment. Expression levels of *cathepsin D* (A), *chitin synthase* (B) and *inhibitor of apoptosis* (C). Statistical differences in relative expression were evaluated between test dsRNAs and GFP dsRNA at the same concentrations. Double asterisks indicate  $P < 0.01$ . CD: *cathepsin D*; CS: *chitin synthase*; IA: *inhibitor of apoptosis*.

## Discussion

Sequence-specific suppression of gene expression by RNAi offers great opportunities for insect science, especially to analyze gene function, pest management and reduce diseases caused by pathogens. A suitable delivery system for dsRNAs can be a major limitation of RNAi studies for insects [20,42–45]. For sap-sucking insects, such as sharpshooters, aphids, whiteflies and psyllids, dsRNA delivery methods have been demonstrated [21,22,26,39,46,47]. In this study, we demonstrated the induction of specific RNAi effects in ACP by oral acquisition of dsRNA from artificial diets and *M. paniculata* leaves.

The artificial diet containing 15% sucrose and food coloring used here was developed for screening dsRNAs for targeting the potato/tomato psyllid, *B. cockerelli* [39], and we adapted this method to evaluate the RNAi effects in *D. citri*. This system was used to evaluate three RNAi target by dsRNA delivery by feeding, and demonstrated its efficiency because the mortality psyllids in the sucrose control treatment was less 5% even after 120 h feeding. Moreover, dsRNAs were stable in the artificial diet solution at last day of the assay showing that this approach can be useful for screening RNAi inducers against *D. citri*. Similar results were observed on artificial diets containing *V-ATPase* dsRNAs for RNAi in *B. dorsalis* [27], *N. lugens* [29] and *B. cockerelli* [39] after 6, 24 and 96 h post feeding, respectively. However, dsRNAs present in artificial diets can be degraded by nucleases in salivary secretions of some insects. For example, aphids feeding of dsRNA of GFP for 84 h resulted in dsRNA degradation, indicating that salivary secretions from the aphids while feeding caused degradation of dsRNAs [24].

The requisite dose of RNAi inducers to cause mortality or phenotypic alterations in insects varies with insect species, life stage, the target gene transcript abundance and its spatial and temporal expression profiles, and according to the delivery method of choice [42]. For example, micro-application of *abnormal wing disc* dsRNA to 5<sup>th</sup> instar of *D. citri* nymphs caused significant nymphal mortality and adult wing-malformation, and these adverse effects and target mRNA knockdown in ACP were positively correlated with the amounts of dsRNA used [16]. In our study, the efficacy of dsRNA on *D. citri* was examined by addition of different concentrations of *cathepsin D*, *chitin synthase* and *inhibitor of apoptosis* dsRNAs on artificial diet over time. The results presented here demonstrate clearly the positive correlation between the dsRNA concentrations and mortality for all target genes tested. All the dsRNAs examined here induced higher mortality than the GFP dsRNA controls, suggesting that the respective mRNAs are good RNAi targets for *D. citri*. To assess whether RNAi-mediated mortality resulted from a corresponding reduction in *cathepsin D*, *chitin synthase* and *inhibitor of apoptosis* mRNA transcript levels, we examined expression of these by qRT-PCR analysis. The down-regulation of the three target gene transcript levels after 120 h feeding dsRNAs on artificial diet at 200, 500 and 1000 ng.μL<sup>-1</sup> were significant compared to GFP dsRNA controls. However, there were not correlations between high dsRNA dosages and reductions in the mRNA expression levels. Probably, high dsRNAs concentrations are related with toxicity effect of dsRNAs in *D. citri* leading to an increase of psyllid mortality generated from off-targets effects or caused by saturation of the RNAi pathway [39,40]. Similar results were reported for

*B. tabaci* and *H. armigera* showing no obvious correlation of increase of dsRNA concentrations with the degree of target mRNA knockdown [26,44].

Using artificial diets is a powerful strategy to screen large numbers of target sequences for RNAi activity, especially for a small and delicate insects such as the adult psyllids, but this method is inefficient to evaluate RNAi effects in nymphs because artificial diets can result in high mortality [48]. To overcome the limitations of artificial diets, a method was modified to target *D. citri* mRNAs by dsRNA feeding through the *M. paniculata* leaflets. This method was used to three target mRNAs by feeding dsRNAs, and demonstrated that it was efficient because the mortality psyllid at control treatment (water) was less 30% up to 11 days feeding. Moreover, dsRNAs of each target and GFP were stable in the dsRNA solution containing the plant leaflet, and dsRNAs could be detected in *M. paniculata* leaves after 11 days-long experiment. *D. citri* survival rates were lower in nymphs that fed on leaflets exposed to the specific dsRNAs than to GFP dsRNA control in all the times evaluated, although on the last day of the assay there was a significant difference in *chitin synthase* and *inhibitor of apoptosis* dsRNAs treatments compared to GFP dsRNA. To confirm that the psyllid mortality resulted from RNAi effects, the expression levels of each target mRNA was evaluated. *Cathepsin D*, *chitin synthase* and *inhibitor of apoptosis* dsRNAs ingested through *M. paniculata* leaves caused significant drops of corresponding transcript levels in *D. citri* compared to control group. A similar tool was developed to explore the roles of whitefly genes involve in the ecdysone pathway using tomato leaflet-mediated dsRNA feeding methods. Results showed that target mRNA knockdown reduced survival and delayed development of the whitefly during nymphal stages. Moreover, the dsRNAs were also stable in the solutions containing the tomato leaflets and in the plant leaves during the five day-long experiment [31], as demonstrated in our work, suggesting that this is a useful tool for functional gene discovery studies of sap-sucking insects. Studies dsRNA stability under different environmental conditions are very important especially for insect control. For example, *N. lugens* and *Ostrinia furnacalis* fed on rice and maize irrigated with solutions containing dsRNAs showed significantly increased mortality rates. Furthermore, dsRNAs were absorbed by crop roots and stable under environmental conditions, indicating that the root dsRNA soaking can be used as a bioinsecticide strategy during crop irrigation [49].

Inhibitor of apoptosis proteins are responsible for several cellular processes, including homeostasis, ubiquitination, intracellular signaling, and cellular division [37]. The RNAi-mediated knockdown of an *inhibitor of apoptosis* gene expression resulted in an unambiguous lethal phenotype in the *Dengue virus* and *Yellow fever virus* mosquito vector, *A. aegypti* [38], and reduction of *Lygus lineolaris* nymphs and adults lifespan [50]. Insect chitin synthases are



the main enzymes for trachea, cuticle and midgut development [35]. Many studies have shown *chitin synthase* mRNA knockdown in insects, for example, *chitin synthase A* dsRNA delivery by injection and artificial diet containing *Escherichia coli* expressing dsRNAs caused disruption of the *S. exigua* larval development which resulted in lethality [28,51]. In addition, microinjection of *chitin synthase 2* dsRNA reduced chitin levels in midguts of *D. virgifera virgifera* [52] and feeding of young tobacco leaves expressing *chitin synthase* dsRNA decreased the net weight of larvae, growth and pupation rates of *H. armigera* [53]. *Cathepsin D* knockdown in *B. mori* by dsRNA injection inhibited programmed cell death of the larval fat body, resulting in the arrest of larval-pupal transformation because cathepsin D is a metamorphosis-specific proteinase involved in metamorphic events [34].

In conclusion, development of reliable RNAi techniques for *D. citri* provides a starting point for assessing gene function and a good way to test and validate possible target sites which can be exploited as new control strategies [14–16]. Our results demonstrate that the oral acquisition of dsRNAs via artificial diets and detached plant leaves causes RNAi effects in different development stages of *D. citri*. This is important and supports the possibility of potentially using RNAi-based strategies for controlling this very important psyllid.

### Acknowledgments

We would like the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo ([2013/02138-0](#) and [2014/03925-8](#)) for support this work. We also thank Dr<sup>a</sup>. Yen-Wen Kuo, Alyssa Oslan and Tera L. Pitman for helpful discussions, advice and assistance.

### References

1. Hall DG, Richardson ML, Ammar E, Halbert SE. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. *Entomol Exp Appl*. 2012;146: 207–223.
2. Bove JM. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J Plant Pathol*. 2006;88: 7–37.
3. da Graça JV. Citrus greening disease. *Annu Rev Phytopathol*. 1991;29: 109–136.
4. Coletta-filho HD, Targon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu J, Machado MA. First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Dis*. 2004;88: 1382.
5. Halbert SE, Manjunath KL. Asian citrus psyllids (Sternorrhynca:Psyllidae) and Greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomol*. 2004;87: 330–353.

6. Inoue H, Ohnishi J, Ito T, Tomimura K, Miyata S, Iwanami T, et al. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. *Ann Appl Biol.* 2009;155: 29–36.
7. Pelz-stelinski AKS, Brlansky RH, Ebert TA, Rogers ME, Brlansky RH, Ebert TA. Transmission Parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera:Psyllidae). *J Econ Entomol.* 2010;103: 1531–1541.
8. Mann RS, Pelz-stelinski K, Hermann SL, Tiwari S, Stelinski LL. Sexual Transmission of a Plant Pathogenic Bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, between Conspecific Insect Vectors during Mating. *PLoS ONE.* 2011;6: 1–8.
9. Grafton-Cardwell EE, Stelinski LL, Stansly PA. Biology and Management of Asian Citrus Psyllid, Vector of the Huanglongbing Pathogens. *Annu Rev Entomol.* 2013;58: 413–432.
10. Yamamoto PT, Felipe MR, Sanches AL, Coelho JHC, Garbim LF, Ximenes NL. Efficacy of Insecticides for Managing *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. *BioAssay.* 2009;4: 1–9.
11. Hoddle MS, Pandey R. Host Range Testing of *Tamarixia radiata* (Hymenoptera:Eulophidae) Sourced From the Punjab of Pakistan for Classical Biological Control of *Diaphorina citri* (Hemiptera:Liviidae:Euphyllurinae:Diaphorinini) in California. *Biol Microb Control.* 2014;107: 125–136.
12. Michaud JP, Olsen LE. Suitability of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, as prey for ladybeetles. *BioControl.* 2004;49: 417–431.
13. Hoy MA, Singh R, Rogers ME. Evaluations of a Novel Isolate of *Isaria fumosorosea* for Control of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae). *Florida Entomol.* 2010;93: 24–32.
14. Killiny N, Hajeri S, Tiwari S, Gowda S, Stelinski LL. Double-Stranded RNA Uptake through Topical Application, Mediates Silencing of Five CYP4 Genes and Suppresses Insecticide Resistance in *Diaphorina citri*. *PLoS ONE.* 2014;9: 1–8.
15. Hajeri S, Killiny N, El-mohtar C, Dawson WO, Gowda S. *Citrus tristeza virus* -based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). *J Biotechnol. Elsevier B.V.;* 2014;176: 42–49.
16. 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. 2013;8: 2–9.
17. Price DRG, Gatehouse JA. RNAi-mediated crop protection against insects. 2008;1: 393–400.
  18. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 1998;391: 806–811.
  19. Baum JA, Roberts JK. Progress Towards RNAi-Mediated Insect Pest Management. Adv Insect Physiol. 2014;47: 249-295.
  20. Yu N, Christiaens O, Liu J, Niu J, Cappelle K, Caccia S, et al. Delivery of dsRNA for RNAi in insects : an overview and future directions. Insect Sci. 2013;20: 4–14.
  21. Wuriyangan H, Falk BW. RNA Interference towards the Potato Psyllid, *Bactericera cockerelli*, Is Induced in Plants Infected with Recombinant *Tobacco mosaic virus* (TMV). PLoS ONE. 2013;8: 1–10.
  22. Upadhyay SK, Chandrashekar K, , Thakur N, Chandra PC, Borgio JF, Singh PK, Tuli R. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. J Biosci. 2011;36: 153–161.
  23. Bolognesi R, Ramaseshadri P, Anderson J, Bachman P, Clinton W, Flannagan R, et al. Characterizing the Mechanism of Action of Double- Stranded RNA Activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). PLoS ONE. 2012;7: 1–11.
  24. Christiaens O, Swevers L, Smagghe G. Peptides DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. Peptides. 2014;53: 307–314.
  25. Jing Y, Zhao-jun HAN. Efficiency of Different Methods for dsRNA delivery in Cotton Bollworm (*Helicoverpa armigera*). J Integr Agric. 2014;13: 115–123.
  26. Li J, Li X, Bai R, Shi Y, Tang Q, An S, et al. RNA interference of the P450 CYP6CM1 gene has different efficacy in B and Q biotypes of *Bemisia tabaci*. Pest Manag Sci. 2014;71: 1175–1181.
  27. Li X, Zhang M, Zhang H. RNA Interference of Four Genes in Adult *Bactrocera dorsalis* by Feeding Their dsRNAs. PLoS ONE. 2011;6: 1–11.
  28. Tian H, Peng H, Yao Q, Chen H, Xie Q, Tang B, et al. Developmental Control of a Lepidopteran Pest *Spodoptera exigua* by Ingestion of Bacteria Expressing dsRNA of a Non-Midgut Gene. PLoS ONE. 2009;4: 1–13.

29. Li J, Chen Q, Lin Y, Jiang T, Hua H. RNA interference in *Nilaparvata lugens* (Homoptera:Delphacidae) based on dsRNA ingestion. *Pest Manag Sci.* 2011; 852–859.
30. Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *2007;25: 1322–1326.*
31. Luan J, Ghanim M, Liu S, Czosnek H. Silencing the ecdysone synthesis and signaling pathway genes disrupts nymphal development in the white fly. *Insect Biochem Mol Biol.* 2013;43: 740–746.
32. K VSR, Renuka P, M SM, Mangrauthia SK. Key Enzymes and Proteins of Crop Insects as Candidate for RNAi Based Gene Silencing. *Front Physiol.* 2015;6: 119.
33. Houseman JONG, Downe AER. Cathepsin d-like activity in the posterior midgut of hemipteran insects. *Comp Biochem Physiol Part B Comp Biochem.* 1983;75: 509–512.
34. Gui ZZ, Lee KS, Kim BY, Choi YS, Wei YD, Choo YM, et al. Functional role of aspartic proteinase cathepsin D in insect metamorphosis. *BMC Dev Biol.* 2006;6: 1–11.
35. Merzendorfer H. Insect chitin synthases: a review. 2006; 1–15.
36. Merzendorfer H, Zimoch L. Review Chitin metabolism in insects structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol.* 2003;206: 4393–4412.
37. Srinivasula SM, Ashwell JD. Review IAPs : What’s in a Name? *Mol Cell.* 2008;30: 123–135.
38. Pridgeon JW, Zhao L, Becnel JJ, Daniel A, Clark GG, Linthicum KJ, et al. Topically Applied AaeIAP1 Double-Stranded RNA Kills Female Adults of *Aedes aegypti*. *J Med Entomol.* 2008;45: 414–420.
39. Wuriyangan H, Rosa C, Falk BW. Oral Delivery of Double-Stranded RNAs and siRNAs Induces RNAi Effects in the Potato/Tomato Psyllid, *Bactericerca cockerelli*. *PLoS ONE.* 2011;6: 1–12.
40. Nunes FMF, Aleixo AC, Barchuk AR, Bomtorin AD, Grozinger CM, Alfenas UF De, et al. Non-Target Effects of Green Fluorescent Protein (GFP)-Derived Double-Stranded RNA (dsRNA-GFP) Used in Honey Bee RNA Interference (RNAi) Assays. *Insects.* 2013;4: 90–103.
41. Jarosch A, Moritz R, Jarosch A, Moritz R. RNA interference in honeybees: off-target effects caused by dsRNA. *Apidologie.* 2012;43: 128–138. doi:10.1007/s13592-011-0092-y
42. Scott JG, Michel K, Bartholomay LC, Siegfried BD, Hunter WB, Smagghe G, et al. Towards the elements of successful insect RNAi. *J Insect Physiol.* 2013;59: 1212–1221.
43. Otti MJZ, Magghe GS. RNAi Technology for Insect Management and Protection of

- Beneficial Insects from Diseases: Lessons, Challenges and Risk Assessments. *Neotrop Entomol.* 2007;44: 197–213.
44. Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, et al. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. 2011;57: 231–245.
  45. Zhang H, Li H, Miao X. Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. *Insect Sci.* 2013;20: 15–30.
  46. Huvenne H, Smaghe G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *J Insect Physiol.* 2010;56: 227–235.
  47. Khan AM, Ashfaq M, Kiss Z, Khan AA, Mansoor S, Falk BW. Use of Recombinant *Tobacco Mosaic Virus* To Achieve RNA Interference in Plants against the Citrus Mealybug, *Planococcus citri* (Hemiptera : Pseudococcidae). *PLoS ONE.* 2013;8: 1–10.
  48. Russell CW, Pelz-stelinski KS. Development of an artificial diet and feeding system for juvenile stages of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Entomol Exp Appl.* 2015;154: 1–6.
  49. Li H, Guan R, Guo H, Miao X. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. *Plant Cell Environ.* 2015;38: 2277–2285.
  50. Benjamin W, Iii W, Allen ML, Iii W. RNA interference-mediated knockdown of IAP in *Lygus lineolaris* induces mortality in adult and pre-adult life stages. *Entomol Exp Appl.* 2011;138: 83–92.
  51. Chen X, Tian H, Zou L, Tang B, Hu J, Zhang W, et al. Bulletin of Entomological Research Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. *Bull Entomol Res.* 2008;98: 613–619.
  52. Alves AP, Lorenzen MD, Beeman RW, Foster JE. RNA interference as a method for target-site screening in the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *J Insect Sci.* 2010;10: 1–16.
  53. Jin S, Singh ND, Li L, Zhang X, Daniell H. Engineered chloroplast dsRNA silences cytochrome p450 monooxygenase, V - ATPase and chitin synthase genes in the insect gut and disrupts *Helicoverpa armigera* larval development and pupation. *Plant Biotechnol J.* 2015;13: 435–446.


**ANEXO II – Declaração de direitos autorais**

**Profa. Dra. Rachel Meneguello**  
Presidente  
Comissão Central de Pós-Graduação  
**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS EM SISTEMA DE RNA INTERFERENTE (RNAi) EM DIAPHORINA CITRI (KUWAYAMA) (HEMIPTERA: LIVIIDAE), VETOR DO HUANGLONGBING DOS CITROS**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 18/07/2016

Assinatura :   
Nome do(a) autor(a): **Diogo Manzano Galdeano**  
RG n.º 343028281

Assinatura :   
Nome do(a) orientador(a): **Marcos Antonio Machado**  
RG n.º M215101

**ANEXO III – Declaração de bioética**

COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
Universidade Estadual de Campinas  
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil  
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br

**DECLARAÇÃO**

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada ***"AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS EM SISTEMA DE RNA INTERFERENTE (RNAi) EM DIAPHORINA CITRI (KUWAYAMA) (HEMIPTERA: LIVIIDAE), VETOR DO HUANGLONGBING DOS CITROS"***, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Diogo  
Nome do(a) aluno(a): Diogo Manzano Galdeano

Assinatura: M. Machado  
Nome do(a) orientador(a): Marcos Antonio Machado

Data: 18/07/2016