

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO

**PREFERÊNCIA DE *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae)  
EM BROTAÇÕES DE CITROS TRATADAS COM dsRNA E  
METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DE  
dsRNA EM SOLO**

**Jonatha dos Santos Silva**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
FEVEREIRO – 2022**

**PREFERÊNCIA DE *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) EM  
BROTAÇÕES DE CITROS TRATADAS COM dsRNA E  
METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DE dsRNA EM  
SOLO**

Jonatha dos Santos Silva  
Bacharel em Biologia, UFRB, 2019

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Agricultura Tropical).

**Orientador:** Prof. Dr. Fernando Haddad  
**Coorientador:** Prof. Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
FEVEREIRO – 2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586p

Silva, Jonatha dos Santos.

Preferência de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psillydae) em brotações de citros tratadas com dsRNA e metodologia para extração e detecção de dsRNA em solo / Jonatha dos Santos Silva. – Cruz das Almas, BA, 2022.

79f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Haddad.

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade.

1.Frutas cítricas – Doenças e pragas – Controle. 2.Citros – Biotecnologia – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO

**PREFERÊNCIA DE *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) EM  
BROTAÇÕES DE CITROS TRATADAS COM dsRNA E  
METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DE dsRNA EM  
SOLO**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de

Jonatha dos Santos Silva

Aprovada em 22 de fevereiro de 2022

Profa. Dra. Marilene Fancelli  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
Examinadora Externa

Prof. Dr. Emanuel Felipe Medeiros Abreu  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Examinador Externo

Prof. Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
Coorientador

## DEDICATÓRIA

**Aos meus pais,  
Maria Cecília e Jose Antônio (*in memoriam*)**

## AGRADECIMENTOS

Esses últimos dois anos foram, sem dúvidas, os mais difíceis da minha vida (até agora) ... um caminho árduo, onde ao mesmo tempo que parece difícil achar gratidão, foram dois anos onde perdi muito, e que me fazem escrever essas palavras com lágrimas nos olhos. Mas também é onde consigo achar muito ao que ou a quem agradecer...

Agradeço aos meus pais. Minha mãe, Maria Cecília, que apesar de não entender muito o que acontece nesse meio acadêmico, apoia e dá forças como pode. E meu pai, José Antônio (*In memoriam*), que silenciosamente, sempre apoiou e ajudou na caminhada acadêmica que decidi seguir.

Sou grato ao meu orientador, Eduardo Chumbinho de Andrade, que me ajudou e acolheu desde a graduação, tendo a paciência para orientar e sendo um exemplo de profissional a ser seguido.

Agradeço a Cícera, técnica do Laboratório de Virologia, que sempre se mostrou disponível para ajudar nos momentos de dificuldade que surgiram dentro do laboratório.

Sou grato ao meu irmão, Thompson, que, apesar de não ser muito bom com as palavras (assim como eu kskks), sei que está de prontidão e apoia, bem como apoiou durante toda e qualquer barra que surgiu durante esse período turbulento e aos próximos que podem surgir.

Sou especialmente grato aos meus amigos mais próximos; Eduardo, Felipe, Breno, Danilo, Dallila (*in memoriam*), Adriele e Amanda. Vocês são um dos pilares da minha vida, e sei que não poderia encontrar amigos melhores que vocês.

Por fim, agradeço ao CNPq (DTI-C) e CAPES (001) pela concessão da bolsa e a todos, que de alguma forma, tenha contribuído para a minha chegada até aqui.

Muito obrigado!

# PREFERÊNCIA DE *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) EM BROTAÇÕES DE CITROS TRATADAS COM dsRNA E METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DE dsRNA EM SOLO

## RESUMO GERAL

Estratégias para proteção de culturas utilizando a tecnologia do RNA interferente (RNAi) se mostram promissoras para a proteção de plantas contra pragas. Apesar de seu potencial, algumas questões sobre a tecnologia precisam ser elucidadas para garantir sua segurança e efetividade. Visando responder parte destas questões, o presente trabalho buscou entender se plantas tratadas com RNA de fita dupla (dsRNA) podem induzir alguma resposta de resistência comportamental em *Diaphorina citri*, bem como estabelecer um método para extração e detecção de dsRNA no solo para se avaliar o tempo máximo de permanência no solo. Para avaliar a sensibilidade do psilídeo à presença do dsRNA em plantas, foi realizada uma série de experimentos de livre escolha para observar a resposta de seleção do inseto entre plantas tratadas e não tratadas com dsRNAs homólogos (dsRNA-AK; dsRNA-Trehal) e não-homólogo (dsRNA-GFP) a genes do psilídeo. Para estabelecer o método de extração de dsRNA em solo, foi coletada amostra de solo, que foi tratada com uma solução de dsRNA-GFP e subamostras foram coletadas em tempos pré-definidos. Para extração do dsRNA, a amostra de solo foi suspendida em 10 mL tampão PBS-T e o sobrenadante foi coletado e filtrado. Cerca de 100 µL do filtrado foi utilizado para extração de RNA total. Os resultados obtidos evidenciam que a presença de moléculas de dsRNA nas brotações não resultou no efeito resistência comportamental a *D. citri*. Além disso, nos ensaios que continham brotações tratadas com dsRNAs específicos ao psilídeo, foi observada elevada mortalidade quando comparado a ensaios que continham brotações tratadas apenas com água ou dsRNA-GFP, corroborando com outros trabalhos que demonstram que a tecnologia de RNAi tem potencial para o controle do psilídeo. Além disso, a metodologia desenvolvida para extrair e detectar a presença das moléculas de dsRNA em solo foi eficiente, e foi possível detectar o dsRNA 136 horas após aplicação em solo, indicando que o dsRNA pode se manter estável no solo por períodos mais longos que os relatados na literatura.

**Palavras-chave:** RNAi, Controle de pragas, Citricultura, HLB

# PREFERENCE OF *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) IN CITRUS FLUSH TREATED WITH dsRNA AND METHODOLOGY FOR EXTRACTION AND DETECTION OF dsRNA IN SOIL

## ABSTRACT

Strategies for crop protection using RNA interfering (RNAi) technology are promising for plant protection against pests. Despite its potential, some questions about the technology need to be elucidated to ensure its safety and effectiveness. In order to answer part of these questions, the present work sought to understand whether plants treated with double-stranded RNA (dsRNA) can induce some behavioral resistance response in *Diaphorina citri*, as well as to establish a method for extraction and detection of dsRNA in soil to evaluate the maximum permanence of these molecules in the soil. To evaluate the sensitivity of the psyllid to the presence of dsRNA in plants, a series of free-choice experiments were performed to observe the insect selection response between plants treated with dsRNAs homologous (dsRNA-AK; dsRNA-Trehal) and non-homologous (dsRNA-GFP) to psyllid genes and untreated. To evaluate dsRNA in soil, a soil sample was collected, a dsRNA-GFP solution was applied and sub-samples were collected at determined intervals. For dsRNA extraction, the soil sample was suspended in 10 mL PBS-T buffer and the supernatant was collected and filtered. About 100  $\mu$ L of the filtrate was used for total RNA extraction. The results obtained show that the presence of dsRNA molecules in the shoots did not result in an effect on behavioral resistance of *D. citri*. Furthermore, in assays that contained shoots treated with psyllid-specific dsRNAs, high mortality was observed when compared to assays that contained shoots treated only with water or dsRNA-GFP, corroborating other studies that demonstrate that RNAi technology has potential for psyllid control. In addition, the methodology developed to extract and detect the presence of dsRNA molecules in soil was efficient, and it was possible to detect dsRNA 136 hours after soil application, indicating that dsRNA can remain stable in soil for longer periods than reported in the literature.

**Key words:** Huanglongbing, HLB, Citriculture, Genetic targets



## LISTA DE TABELAS

**CAPÍTULO 1:** Preferência de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) em brotações de citros tratadas com dsRNAs

**Tabela 1.** Iniciadores usados para produção e detecção de dsRNAs.....53

**Tabela 2.** Esquema dos bioensaios de livre escolha montados.....55

**Tabela 3.** Análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste F.....57

**CAPÍTULO 2:** Metodologia para extração e detecção de dsRNA em solo e avaliação da sua dinâmica de degradação

**Tabela 1.** Iniciadores usados para detecção do dsRNA-GFP.....72

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

**Figura 1.** Estádios de desenvolvimento de *Diaphorina citri*..... 21

**Figura 2.** Mecanismo de RNA interferente para as vias guiadas por siRNA e miRNA.  
..... 27

### **CAPÍTULO 1:** Preferência de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) em brotações de citros tratadas com dsRNAs

**Figura 1.** Esquema da instalação do bioensaio de livre escolha e liberação dos adultos de *D. citri*.....54

**Figura 2.** Comportamento de seleção de hospedeiro por *Diaphorina citri* em brotações tratadas com dsRNA ou água.....57

### **CAPÍTULO 2:** Metodologia para extração e detecção de dsRNA em solo

**Figura 1.** Montagem do experimento para extração de dsRNA em solo.....70

**Figura 2.** Eletroforese dos produtos de RT-PCR para detecção do dsRNA-GFP em solo após diferentes períodos de incubação.....72

**Figura 3.** Curva de amplificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para as amostras de 1 a 136 horas para as profundidades de 0-10 e de 10-20 cm..... 74

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>15</b>
2.1 Citricultura brasileira	15
2.2 Huanglongbing (HLB)	16
2.3 Inseto vetor; <i>Diaphorina citri</i>	19
2.4 Possíveis estratégias de interferência no comportamento e controle de <i>Diaphorina citri</i>	22
2.5 O mecanismo de RNA interferente	25
2.6 Estratégias de uso da tecnologia de RNAi	28
2.7 Considerações relevantes para a aplicação do RNAi no controle de pragas	30
2.8 Métodos de aplicação de produtos contendo dsRNA	31
2.9 Aspectos ambientais: acúmulo de dsRNA no solo	33
<b>3. REFERÊNCIAS</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO 1 – Preferência de <i>Diaphorina citri</i> (Hemiptera: Psyllidae) em brotações de citros tratadas com dsRNAs</b>	<b>48</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>50</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>52</b>
2.1 Material biológico; mudas cítricas e colônia de insetos	52
2.2 Seleção dos dsRNAs	52
2.3 Síntese das moléculas de dsRNA	52
2.4 Bioensaio	53
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>61</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO 2 – Metodologia para extração e detecção de dsRNA em solo e avaliação da sua dinâmica de degradação</b>	<b>66</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>68</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>69</b>
2.1 Seleção do dsRNA e do local para coleta do solo	69
2.2 Coleta de solo e aplicação do dsRNA	69
2.3 Extração das amostras	70
2.4 Reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	71
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>72</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>74</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>76</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	<b>77</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de citros, e no ano de 2019, contribuiu com cerca de 21,7% da produção global (FAO, 2020; USDA, 2020). O país assume a posição de maior produtor e exportador de suco de laranja, sendo responsável por mais da metade do suco produzido no mundo (NEVES; TROMBIN, 2017; USDA, 2020). A produção nacional de laranja (*in natura*) em 2019 foi cerca de 17 milhões de toneladas (IBGE, 2020). Apesar de bem estabelecido, o cultivo de citros vem enfrentando uma série de problemas fitossanitários que limitam a produção, principalmente a proliferação de insetos-praga e patógenos (CHAVEZ et al., 2017).

Um dos principais problemas fitossanitários da cultura é a doença conhecida como *Huanglongbing* (HLB) ou Greening dos citros (BOVÉ, 2006; CHAVEZ et al., 2017). No Brasil, a doença foi identificada em 2004 no estado de São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004), e hoje se encontra disseminada pelos estados do Paraná, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul (MENEGUIM et al., 2008; CASTRO et al., 2010; DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO 2019).

O HLB é causado por bactérias pertencentes ao gênero *Candidatus Liberibacter* (*Ca. L.*), existindo quatro espécies; *Ca. Liberibacter asiaticus* (*Ca. Las*), *Ca. Liberibacter africanus* (*Ca. Laf*), *Ca. Liberibacter americanus* (*Ca. Lam*) e *Ca. Liberibacter caribbeanus* (*Ca. Lca*) (TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006; KEREMANE et al., 2015). Estas bactérias são restritas ao floema e promovem alterações anatômicas e fisiológicas que causam o colapso do sistema vascular por obstrução e necrose, o que resulta, inicialmente, na morte econômica das plantas infectadas. Não obstante, a morte biológica das plantas infectadas pode ocorrer entre 4 e 7 anos após infecção (BOVÉ, 2006).

Na Ásia e América, a transmissão do agente causal do HLB é feita pelo psilídeo dos citros *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) (TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006; CHAVEZ et al., 2017). O controle de *D. citri* é baseado no uso de pesticidas sintéticos (QURESHI et al., 2014), que podem causar impacto negativo ao meio ambiente, com seleção de insetos resistentes, como observado por Naeen et al. (2019) para o inseticida tiametoxam, um inseticida de amplo espectro e que é uma das principais ferramentas para o controle do psilídeo nas

últimas décadas. Com isso, há a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias de controle que sejam eficientes e ambientalmente sustentáveis.

Estratégias para proteção de culturas utilizando vias genéticas vêm sendo estudadas ao longo dos últimos anos e se mostram altamente promissoras. A tecnologia do RNA interferente (RNAi) tem sido uma das apostas mais favoráveis para a proteção de plantas contra pragas.

O RNAi é um mecanismo natural que ocorre em células eucarióticas e está envolvido na regulação gênica e defesa antiviral (FIRE et al., 1998). O mecanismo é ativado por moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA), (denominada de molécula gatilho), que pode ser expressa ou introduzida na célula, levando à degradação de RNAs mensageiros (mRNAs) homólogos ao dsRNA, resultando na diminuição da expressão ou supressão total do gene (FIRE et al., 1998; FIRE, 2007).

Nos últimos 15 anos, diferentes grupos de pesquisa têm demonstrado a possibilidade de se usar o mecanismo de RNAi para o controle de insetos-praga e patógenos na agricultura (BAUM et al., 2007; MAO et al., 2007; KOCK et al., 2016; ANDRADE; HUNTER, 2017; RODRIGUES et al., 2021). O desenvolvimento de medidas de controle via RNAi torna possível a produção de defensivos agrícolas biológicos, que resultarão na diminuição dos impactos negativos para o ecossistema e à própria cultura ao promover o “Controle de Pragas Altamente Específico” (Highly Specific Pest Control – HiSPeC) (WANG et al., 2011; ANDRADE; HUNTER, 2016). Recentemente foi solicitado junto à agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA) o registro do primeiro produto pulverizável a base de dsRNA para controle de um inseto-praga. O produto denominado de Ledprona foi desenvolvido para o controle do besouro da batata, *Leptinotarsa decemlineata* e caso seja aprovado pela EPA será o primeiro pesticida à base de RNAi no mundo (RODRIGUES et al., 2021).

Estratégias utilizando os princípios do RNAi vêm sendo estudadas a fim de elaborar métodos para o controle de *D. citri* (TANING et al., 2016; ANDRADE; HUNTER, 2016, 2017). Neste panorama, tem-se o surgimento de algumas questões. Uma destas está relacionada à capacidade de “percepção” do inseto à presença do dsRNA em uma planta; podendo ser interpretada como uma resposta de resistência comportamental. Além desta, existe a preocupação de um potencial acúmulo do dsRNA no ambiente após sua aplicação, principalmente no solo. Assim,

é imperativo determinar a duração e possíveis rotas de destino de defensivos à base de dsRNA no ambiente.

Neste sentido, o presente trabalho visou avaliar o possível efeito de antibiose e antixenose de brotações de citros tratadas com moléculas de dsRNA homólogas e não-homólogas ao psilídeo *D. citri*. Além disso, este trabalho buscou estabelecer uma metodologia para a extração e detecção de dsRNA no solo com vistas a ser utilizado em estudos de bioacúmulo da molécula.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Citricultura brasileira

O gênero *Citrus* é o mais importante, do ponto de vista econômico, da família Rutaceae. Existem diversas espécies, variedades e cultivares de citros que se destacam como as de maior importância comercial; laranjas doces, tangerinas, limões, limas ácidas, e pomelos (DONADIO et al., 1998; BASTOS et al., 2014). O Brasil é líder mundial em produção de laranjas, seguido pela China, Índia e Estados Unidos (FAO, 2020; USDA, 2020). Além das laranjas, as frutas cítricas mais produzidas no país são as limas ácidas e tangerinas (KIST et al., 2016).

Evidências sugerem que a laranja é originária do Sul do continente asiático (China). A expansão do comércio e guerras promoveram a dispersão dos citros para o resto do mundo. Os citros foram introduzidos na Europa durante a Idade Média, por ação dos árabes, e na América a partir de 1500, via expedições marítimas (NEVES et al., 2010, 2012). No Brasil, a introdução ocorreu no início da colonização, onde a laranja encontrou excelentes condições de cultivo e alta adaptabilidade às características edafoclimáticas do território nacional, podendo ser cultivada em todo o país (NEVES et al., 2010).

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

A região de maior produção é denominada de Cinturão citrícola, compreendendo o estado de São Paulo, sudoeste de Minas Gerais e uma parte do Triângulo mineiro (BARROS et al., 2016). O estado de São Paulo é o maior produtor nacional, e representa 62% da área de produção do país, e em 2019 foi responsável por aproximadamente 77,6% do volume colhido; seguido por Minas Gerais, Paraná e Bahia (BARROS et al., 2016; KIST et al., 2016; IBGE, 2020). A região Nordeste é a segunda maior produtora nacional, com mais de 1,1 milhões de toneladas produzidas, em cerca de 106.000 hectares cultivados, representando

aproximadamente 6,45% da produção do país (IBGE, 2020). Os estados da Bahia e Sergipe correspondem a 85% da produção nordestina (IBGE, 2020).

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

No entanto, a citricultura brasileira e mundial vem enfrentando desafios no que se refere a problemas fitossanitários que reduzem a produtividade e causam o aumento do custo de produção. Entre os anos de 2000 e 2010, foram erradicados aproximadamente 40 milhões de árvores devido à incidência de pragas e doenças, contabilizando perdas de até 80 milhões de caixas por ano (NEVES et al., 2010). As doenças de maior importância para citricultura são: a clorose variegada dos citros (CVC), o cancro cítrico, a morte súbita (MSC), e o Huanglongbing (HLB) ou Greening dos citros, considerada a doença mais severa e importante na citricultura mundial (BOVÉ, 2006; NEVES et al., 2010; KIST et al., 2016).

## **2.2 Huanglongbing (HLB)**

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

O HLB é considerado por muitos autores a mais severa doença da citricultura mundial devido às dificuldades de controle e severidade de seus sintomas; rápida disseminação, elevadas perdas de produção e qualidade dos frutos. Ramadugu et al. (2016) observaram dois gêneros (*Microcitrus* e *Eremocitrus*) próximos e sexualmente compatíveis com *Citrus*, que apresentam resistência ao HLB. Entretanto, até o momento, não há nenhuma variedade comercial ou porta-enxerto resistente a doença (BOVÉ, 2006; GOTTWALD et al., 2007; RAITHORE et al., 2015). Os sintomas podem ser observados durante todo ano, mas com maior



frequência durante os meses mais frios, a partir do fim do verão até o início da primavera (FUNDECITRUS, 2009).

A doença foi reportada na América apenas em 2004, no estado de São Paulo, Brasil (COLETTA FILHO et al., 2004). Atualmente, além do estado de São Paulo, a doença pode ser encontrada em Minas Gerais, Paraná e Mato Grosso do Sul (MENEGUIM et al., 2008; CASTRO et al., 2010; DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO 2019). Levantamento feito nas regiões citrícolas dos Estados de SP e MG revelou que aproximadamente 22,37% das plantas (cerca de 43,4 milhões) apresentam sintomas do HLB (FUNDECITRUS, 2021). Desde o aparecimento do HLB no Brasil, os citricultores têm feito a erradicação das plantas infectadas com o HLB, ação que é inquerida pela Instrução Normativa Federal nº 53 de 16/10/2008. De acordo com a Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo (2019), foram eliminadas cerca de 55,5 milhões de árvores de laranja com sintomas de HLB entre os anos de 2005 e 2019. Além disso, também é feito o controle rígido do inseto vetor nas regiões afetadas pela doença, o que vem garantindo a uma baixa taxa de disseminação e elevados níveis de produção nas áreas afetadas pela doença (FUNDECITRUS, 2017).

Em 2005, a doença foi registrada na Flórida, Estados Unidos. Desde sua chegada, o estado adotou diversas medidas malsucedidas na tentativa de curar ou reduzir os sintomas do HLB. Além disso, como não há legislação que obrigue a erradicação de plantas doentes, muitos produtores preferiram manter plantas infectadas ao invés de erradicá-las e não há ações conjuntas para manejo do HLB (HALBERT et al., 2012; LOPES et al., 2014; VASHISTH; LIVINGSTON, 2019; BASSANEZI et al., 2020). Como consequência, a produção de laranjas para processamento e fruta fresca na Flórida caiu cerca de 72,2% e 20,5%, respectivamente, entre as safras de 2007/08 a 2017/18. Desde a detecção do HLB no país, houve o acréscimo de aproximadamente 320% no custo de produção do setor. Estima-se que 90% a 100% dos pomares da Flórida estejam infectados com o HLB (SINGERMAN et al., 2017; DALA-PAULA et al., 2019; BASSANEZI et al., 2020).

Os sintomas nas plantas infectadas podem ser caracterizados pelo surgimento de ramos com folhas apresentando manchas irregulares em tons de amarelo que se destacam devido ao contraste com folhas dos ramos não afetados da copa, folhas com mosqueamento ou clorose assimétrica em relação aos lados

opostos do limbo foliar (delimitado pela nervura central) (FUNDECITRUS, 2009). Estes sintomas podem ser confundidos com deficiências nutricionais de zinco, manganês, magnésio e cobre ou mesmo outras doenças como a Clorose Variegada dos Citros (CVC) e Gomose (BOVÉ, 2006; FUNDECITRUS, 2009). Os ramos afetados podem apresentar folhas de tamanho reduzido e curvadas, além de nervuras grossas e escurecidas, há também um alto índice de desfolha, e, nos casos mais graves, a morte dos ponteiros (BELASQUE JR. et al., 2009). Os frutos gerados são pequenos, malformados e assimétricos, muitas vezes se desprendem da planta precocemente (BOVÉ, 2006; FUNDECITRUS, 2009). Além disso, as características organolépticas dos frutos são alteradas, apresentando um alto teor de acidez (BASSANEZI et al., 2009). As sementes dos frutos são abortadas, de tamanho pequeno e coloração escurecida (FUNDECITRUS, 2009). Há também o comprometimento do sistema radicular, que apresenta baixo desenvolvimento; conseqüentemente, é possível observar plantas de tamanho reduzido, atrofiadas e raquíticas (DA GRAÇA, 1991; AUBERT, 1992; GRAHAM et al., 2013).

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

O HLB é causado por bactérias gram-negativas pertencentes ao filo das proteobactérias, subdivisão  $\alpha$  (Alphaproteobactéria), ordem Rhizobiales, família Rhizobiaceae (GARNIER et al., 1984). Pertencem ao gênero *Candidatus Liberibacter* (*Ca. L.*), existindo quatro espécies: *Ca. Liberibacter asiaticus* (*Ca. Las*), *Ca. Liberibacter africanus* (*Ca. Laf*), *Ca. Liberibacter americanus* (*Ca. Lam*) e *Ca. Liberibacter caribbeanus* (*Ca. Lca*) (TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006; KEREMANE et al., 2015; CHAVEZ et al., 2017). Devido às dificuldades de cultivo *in vitro* dessas bactérias, sua classificação taxonômica não é definitiva, e o status de *Candidatus* é utilizado como prefixo de denominação temporária (MURRAY; SCHLEIFER, 1994). A classificação da bactéria foi estabelecida por microscopia eletrônica e comparação de seqüências do DNA ribossomal, região 16S (GARNIER et al., 1984; JAGOUEIX et al., 1994; SECHLER et al., 2009).

Na planta, estas bactérias são restritas ao floema e promovem alterações anatômicas, morfológicas e fisiológicas devido à colonização dos tubos do floema, promovendo o acúmulo de amido no sistema vascular. A obstrução do floema

impede o fluxo e distribuição dos fotoassimilados sintetizados na copa, dificultando a translocação de macro e micronutrientes, causando a morte comercial das plantas infectadas em curto prazo e morte biológica a longo prazo (BOVÉ, 2006; ETXEBERRIA et al., 2009; CHAVEZ et al., 2017).

A transmissão do agente causal do HLB não ocorre pelas técnicas de manejo agrícola, uso de ferramentas, água ou vento (FUNDECITRUS, 2013), mas por meio de vetores. Em campo, a transmissão pode ser feita por duas espécies de psílídeos; *Trioza erytreae* Del Guercio (Hemiptera: Psyllidae) e *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). A espécie *T. erytreae* é considerada o principal vetor de *Ca. Laf*, uma vez que a distribuição de ambos ocorre nas mesmas regiões do continente africano (BOVÉ; GARNIER, 1984; HALBERT; MANJUNATH 2004). Contudo, *D. citri* é considerado o principal vetor do HLB devido a sua ampla distribuição nos principais centros de produção citrícola na Ásia e América (TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006; CHAVEZ et al., 2017). Além disso, a transmissão também pode ocorrer por meio da enxertia de material propagativo infectado (COLETTA-FILHO et al., 2010).

A interação vetor-patógeno é persistente; após a bactéria ser adquirida, pode ser detectada e transmitida durante toda a vida do inseto (HUNG et al., 2004; PELZ-STELINSKI et al., 2010). São necessários apenas 30 minutos de alimentação em uma planta infectada para o psílídeo adquirir a bactéria, e entre 15 a 30 minutos para transmitir o patógeno para uma planta sadia, com maior eficiência de transmissão após períodos mais extensos de alimentação (ROISTACHER, 1991; MEAD; FASULO, 2011; ROGERS; STANSLY, 2012).

Até o momento, não há medidas adequadas ao manejo da bactéria. O tratamento de plantas infectadas por termoterapia ou uso de antibióticos tem se mostrado ineficaz, além de um potencial risco ambiental. A prevenção da infecção é a melhor forma de controle da doença, neste sentido, o plantio de mudas sadias, a erradicação de plantas infectadas e a supressão do inseto vetor são essenciais (BOVÉ, 2006; LOPES et al., 2007).

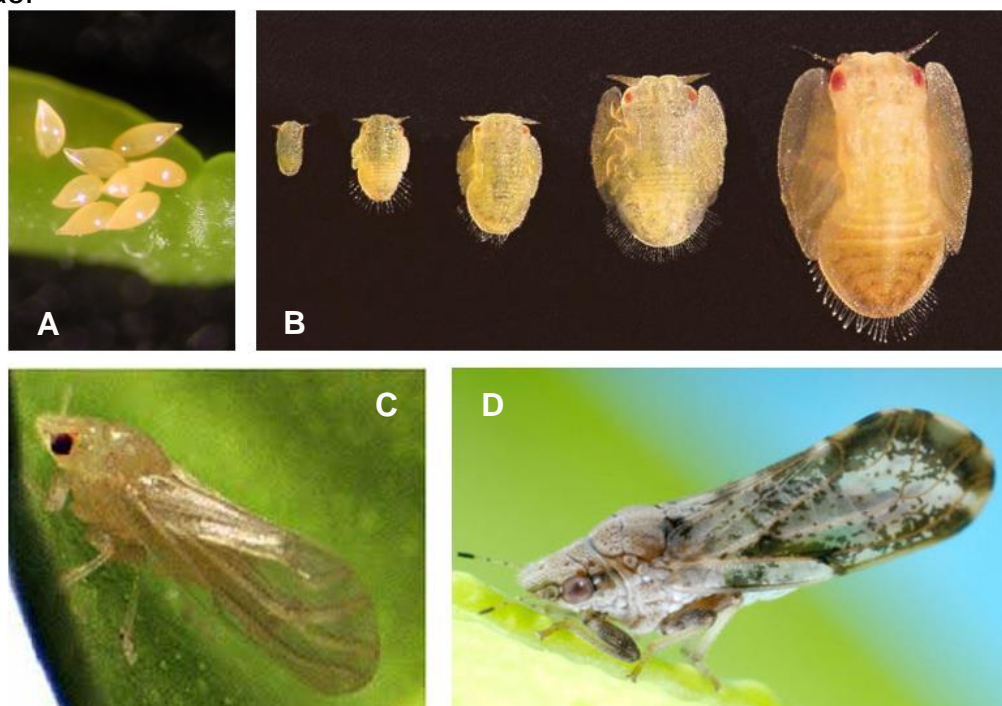
### **2.3 Inseto vetor; *Diaphorina citri***

O psílídeo dos citros, *Diaphorina citri*, é originário do sul asiático, sendo descrito pela primeira vez em citros na cidade de Shinchiku, Taiwan, em 1907. No Brasil, o primeiro registro de *D. citri* foi em 1942 (COSTA LIMA, 1942; HALBERT;

MANJUNATH, 2004; COLETTA-FILHO et al., 2004; BOVÉ, 2006). O psilídeo possui uma ampla distribuição, estando presente no Sul da Ásia, Arábia Saudita, América do Sul, Central e Sul dos Estados Unidos, por esta razão e por ser vetor do HLB, *D. citri* é considerado o mais importante inseto-praga da citricultura mundial (HOLLIS, 1987; HALBERT; MANJUNATH, 2004; TEIXEIRA et al., 2005; PORTALANZA et al., 2017).

*Diaphorina citri* possui um ciclo de vida curto, variando entre 15 e 47 dias (ovo-adulto), dependendo da temperatura (LIU; TSAI, 2000). São encontrados preferencialmente nas brotações mais jovens, onde as fêmeas fazem a postura dos ovos (CHAVAN; SUMMANWAR, 1993). Os ovos possuem cor amarelada, e tamanho médio de 0,31 mm de comprimento e 0,14 mm de largura (Figura 1A), e eclodem em 2 a 4 dias após a postura (LIU; TSAI, 2000). As ninfas passam por cinco estádios intermediários (instares) (Figura 1B), que se completam entre 11 a 15 dias. O inseto adulto, ao emergir, apresenta coloração esbranquiçada (Figura 1C), tornando-se mais escuro após algumas horas (Figura 1D), mas tende a perder a coloração à medida que envelhece (CHAVAN; SUMMANWAR, 1993). Estes insetos apresentam variação na coloração do abdômen, podendo apresentar-se cinza, azul esverdeado e amarelo alaranjado (WENNINGER; HALL, 2008). O inseto adulto possui uma expectativa de vida de até 90 dias, e neste período uma fêmea pode colocar até 800 ovos (LIU; TSAI, 2000; PARRA et al., 2010).

**Figura 1.** Estádios de desenvolvimento de *Diaphorina citri*. (A) Ovos. (B) Ninfas do primeiro ao quinto instar (da esquerda para direita). (C) Adulto recém-emergido, apresentando coloração esbranquiçada. (D) Adulto apresentando coloração padrão.



Autores: David Hall (A e B); Thalita de Freitas Albuquerque (C); Douglas L. Caldwell (D).

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

O psilídeo dos citros consegue se desenvolver em uma faixa de temperatura que varia entre 15 e 30 °C, contudo o intervalo ótimo de desenvolvimento é entre 25 e 28 °C (LIU; TSAI, 2000). *Diaphorina citri* não consegue completar seu ciclo de vida em temperaturas inferiores a 10 °C ou superiores a 33 °C (LIU; TSAI, 2000). O

inseto pode ser encontrado durante todo o ano, entretanto, os picos populacionais ocorrem entre a primavera e verão; em contrapartida, nas estações chuvosas, a população do inseto pode ser suprimida (YAMAMOTO et al., 2001; TSAI et al., 2002).

O psilídeo dos citros possui hábito diurno, e sua atividade em campo é restrita às horas de luz do dia (WENNINGER; HALL, 2008). A flutuação da população de *D. citri* em campo está relacionada ao fluxo vegetativo do pomar, à disponibilidade de brotações, à faixa de temperatura ideal para seu desenvolvimento e às taxas pluviométricas (LIU; TSAI, 2000; YAMAMOTO et al., 2001). Neste sentido, o monitoramento populacional do inseto é de grande importância para manejo do HLB, e deve ser feito por todos os citricultores de uma mesma região. O fluxo de psilídeos pode ocorrer entre pomares sem manejo e pomares sob ações de controle, mesmo com uso de pesticidas, e este fluxo favorece a formação de novas áreas com infecções primárias (BOINA et al., 2009; FUNDECITRUS, 2019).

#### **2.4 Possíveis estratégias de interferência no comportamento e controle de *Diaphorina citri***

A seleção de um hospedeiro por insetos pode influenciar diretamente nas perdas de produção, seja pela transmissão de patógenos ou predação da planta hospedeira. A comunicação planta-inseto é de grande importância durante este processo e ocorre pela liberação e identificação de diversos sinais químicos; compostos voláteis orgânicos (COV's). Os COV's, além de outros fatores, podem influenciar diretamente numa resposta de atração ou repelência por parte de insetos a um dado hospedeiro (AKSENOV et al., 2014; VOLPE et al., 2015; ALQUÉZAR et al., 2017). Entender este mecanismo pode abrir caminho para desenvolvimento de métodos ou estratégias de controle para diversas pragas agrícolas. Muitos destes compostos químicos já são relacionados a resposta de defesa contra ataques de insetos (KOST; HEIL, 2006; AKSENOV et al., 2014; HIJAZ et al., 2016).

As plantas cítricas são conhecidas por produzir diversos COV's (como o limoneno, hidrocarboneto da família dos terpenos), os quais podem desempenhar atividade atrativa ao psilídeo dos citros (TSAI; LIU, 2000; AMORÓS et al., 2019). A escolha da planta hospedeira por *D. citri* pode ser influenciada por diversos fatores como o estágio de maturação do tecido foliar, sinais visuais, químicos, olfatórios e

gustativos, e mesmo pequenas alterações nesses estímulos podem influenciar na resposta comportamental de *D. citri* (PATT et al., 2011; AMMAR et al., 2013; RUAN et al., 2015; HALL et al., 2015; EBERT et al., 2018).

Os aspectos fitossanitários da planta hospedeira também são relevantes no processo de escolha. Infecções patogênicas podem alterar o padrão dos COV's produzidos pela planta hospedeira, tornando-as mais suscetíveis ao ataque de herbívoros e mais atrativas a insetos vetores, aumentando a propagação do patógeno (MAUCK et al., 2010; DAVIS et al., 2012; CEN et al., 2012). Mann et al. (2012) observaram que plantas de citros infectadas com o HLB liberam maiores quantidade de salicilato de metila. Também observaram que plantas não infectadas passam a liberar salicilato de metila em proporções semelhantes às plantas infectadas com o HLB durante a alimentação destes insetos. A alteração na liberação deste composto químico torna as plantas mais atrativas ao psíldeo.

Alguns pesquisadores demonstraram a possibilidade do uso dos COVs para manipular o comportamento de seleção de hospedeiro do psíldeo, como forma de auxílio no controle destes insetos, sejam eles atrativos ou repelentes (AKSENOV et al., 2014; ALQUÉZAR et al., 2017). Químicos atrativos podem ser utilizados para monitoramento de densidade populacional de *D. citri* em uma região, auxiliando em tomadas de decisão para controle da mesma, ou mesmo, com a produção de armadilhas que visem a redução populacional do inseto (MARTINI et al., 2020). Os COV's repelentes, por sua vez, podem reduzir o número de insetos que pousam em uma muda, o que promove por consequência, a redução de alimentação, colonização e oviposição desses insetos (VOLPE et al., 2015; ALQUÉZAR et al., 2017).

Estas características podem ser associadas a resistência de plantas ao ataque de pragas, a qual, pode alterar o comportamento do inseto, e está dividida em três categorias: antixenose, antibiose e tolerância (PAINTER, 1951; LARA, 1991; BALDIN et al., 2019). A antixenose se apresenta quando uma planta ou variedade apresenta características, seja física ou química, que a torne menos utilizada pelo inseto, afetando-o negativamente seja na alimentação, oviposição ou colonização do hospedeiro. O efeito é observado no comportamento do inseto, pela redução da atratividade e aceitação do hospedeiro. A antibiose caracteriza-se quando o inseto se alimenta normalmente da planta, porém efeitos adversos provocados pela planta promovem alterações no seu desenvolvimento;

mortalidade, baixa eficiência no surgimento de novas gerações ou fecundidade, redução do tamanho e peso dos indivíduos, além de alteração no tempo de vida ou longevidade. Por fim, a tolerância é observada quando a planta suporta os danos causado pela praga, sem perda qualitativa e quantitativa da produção (PAINTER, 1951; SMITH, 2005; FANCELLI; VENDRAMIM, 2010).

No entanto, o controle de *D. citri* é feito principalmente através do uso de inseticidas, e os citricultores dispõem de uma grande variedade destes, sejam de contato ou sistêmicos (YAMAMOTO et al., 2009; QURESHI et al., 2014; IQBAL et al., 2020). A baixa seletividade de alguns pesticidas pode promover o aumento do custo ambiental, uma vez que podem eliminar a fauna benéfica e favorecer a seleção de populações de insetos-praga resistentes (YAMAMOTO et al., 2009; RUIZ-GALVÁN et al., 2015; TOFANGSAZI et al., 2018; NAEEN et al., 2019). Dentre os possíveis mecanismos de resistência de insetos à inseticidas, tem-se a resistência comportamental (DANG et al., 2017; ZALUCKI; FURLONG, 2017). Para que isto ocorra, o inseto deve ser estimulado sensorialmente para detectar uma superfície ou material tratado com uma toxina antes que adquira uma dose letal, ocasionando uma resposta de evitação ou repelência desencadeada pelo tóxico. Esta reação pode ser caracterizada como resistência comportamental dependente de estímulo (GEORGHIOU, 1972; LOCKWOOD et al., 1984; CHAREONVIRIYAPHAP et al., 2013; DANG et al., 2017). Não obstante, há também o comportamento independente de estímulos, na qual o inseto evita exposição à substância tóxica, sem que haja estímulo sensorial (LOCKWOOD et al., 1984; GATTON et al., 2013; SOKHNA et al., 2013; KILLEEN; CHITNIS, 2014; DANG et al., 2017).

Este tipo de comportamento, já foi observado em diferentes grupos de insetos. Wada-katsumata et al. (2013) observaram que baratas alemãs, *Blattella germanica*, desenvolveram comportamento de aversão a glicose para evitar iscas contendo este açúcar. Foi observado que essa é uma característica herdável e desencadeada apenas pela glicose. Estudo demonstram que mosquitos, vetor da malária, desenvolveram a capacidade de evadir de doses letais de inseticidas ao evitar ambientes internos, sugerindo a resistência comportamental (GATTON et al., 2013; SOKHNA et al., 2013; KILLEEN; CHITNIS, 2014). Algo similar foi também observado em diversos estudos com *Helicoverpa armigera*, que demonstraram que



larvas desta espécie possuem a capacidade de detectar e evitar plantas tratadas com toxinas Bt (ZHANG, et al., 2004; MEN, et al., 2005; ZHAO et al., 2016).

## 2.5 O mecanismo de RNA interferente

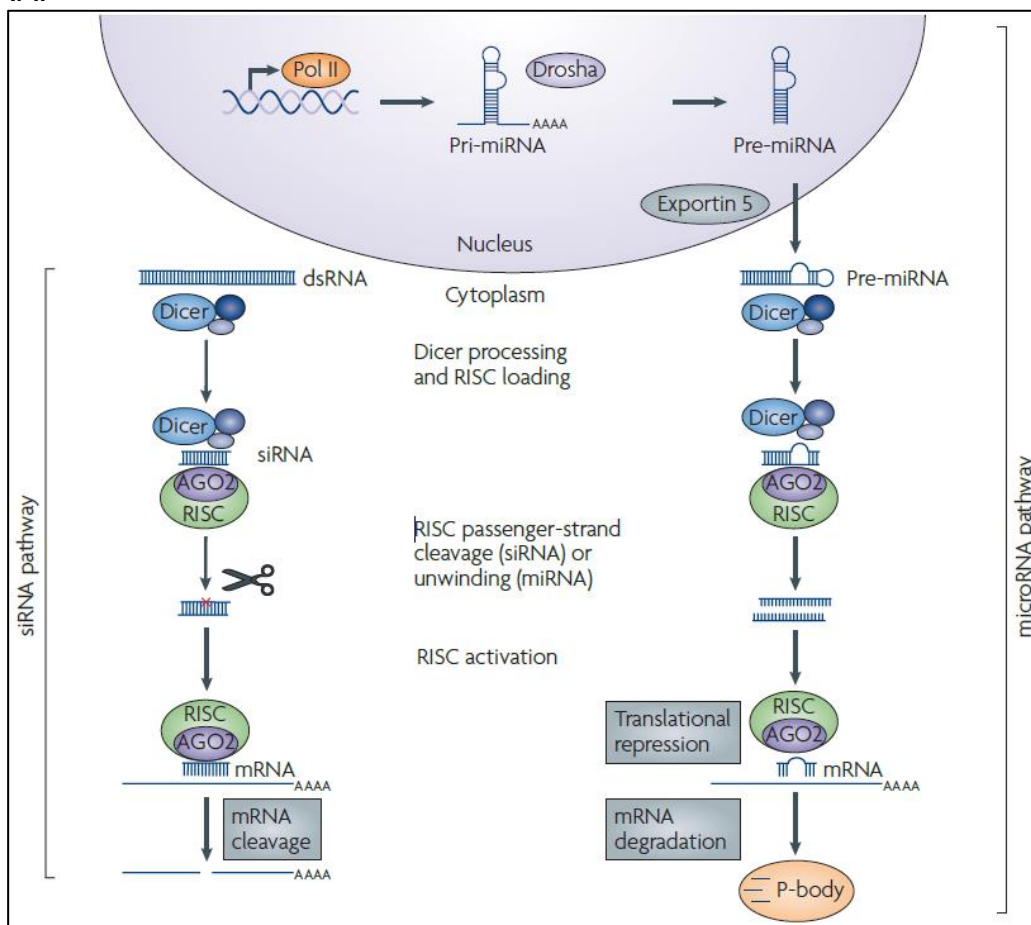
O mecanismo de RNA interferente (RNAi) foi observado pela primeira vez em 1990 por pesquisadores que buscavam alterar geneticamente a coloração de flores de plantas do gênero *Petunia*, inserindo uma cópia extra do gene da Chalcone sintase (CHS), responsável pela biossíntese de antocianinas (NAPOLI et al., 1990). Entretanto, o que se obteve foram linhagens que apresentavam flores com diferentes padrões de variegação ou mesmo com nenhuma pigmentação (brancas). Foi constatado que a despigmentação estava relacionada à diminuição dos níveis do mRNA do CHS, tanto do gene endógeno quanto da cópia introduzida. Este fenômeno foi denominado como co-supressão (NAPOLI et al., 1990). Em 1998, foi constatado que o mecanismo era ativado de forma eficiente no nematoide *Caenorhabditis elegans* via alimentação oral por moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA) (FIRE et al., 1998). Estes resultados mostraram que era possível o controle de pragas pela administração oral de dsRNA, abrindo o caminho para o que hoje se denomina tecnologia de RNAi.

O silenciamento gênico via RNAi pode ocorrer tanto pelo impedimento da tradução do mRNA, quanto pela sua degradação, resultando na diminuição da expressão ou supressão total da expressão do gene homólogo ao dsRNA. Os dsRNAs podem ser classificados em duas principais categorias de acordo com sua função e origem; micro RNAs (miRNAs) e pequenos RNAs interferentes (siRNA – small interfering RNA). Os miRNAs se originam de um transcrito primário longo, que ainda no núcleo, assumem formato de fita dupla, sofre processamento via complexo enzimático mediado por uma RNase III (Drosha), tornando-se pré-miRNAs, de aproximadamente 70 pb. Este pré-miRNA é exportado para o citoplasma, onde é processado por uma ribonuclease III, chamada Dicer, formando um miRNA maduro, com cerca de 19-21 nucleotídeos. Os siRNAs são originados do processamento de moléculas de dsRNA exógenas (vírus, transposons ou sintetizados), que ao entrarem na célula, são processados pela Dicer em siRNAs com tamanhos entre 19 a 30 pares de bases (CARMELL et al., 2002; MORRIS et al., 2004; RAJA et al., 2019; GOULIN et al., 2019; HUNG; SLOTKIN, 2021). siRNAs podem ser sintetizados *in vitro*, e introduzidos na célula alvo. Uma vez gerados, o miRNA e

siRNA são acoplados a um complexo proteico conhecido como o complexo de silenciamento induzido por RNA (RNA Induced Silencing Complex, RISC) promovendo o silenciamento gênico (YI et al., 2003; TOMARI; ZAMORE, 2005; RIVAS et al., 2005; RAJA et al., 2019; GOULIN et al., 2019; HUNG; SLOTKIN, 2021).

Em mais detalhes, o processo básico do RNAi pode ser dividido em três etapas principais. Primeiro, o mecanismo é ativado pela presença de uma molécula de dsRNA (denominada de molécula gatilho). Este dsRNA é então cortado em pequenos RNAs de fita dupla (19-30 nt), chamados de siRNA, pela enzima Dicer. Na segunda etapa do mecanismo de RNAi, uma das fitas do siRNA é removida e a fita que permanece (chamada de fita guia) é incorporada ao RISC. Na última etapa, o complexo RISC atua para identificar e degradar mRNAs que compartilhem homologia com o siRNA (TOMARI; ZAMORE, 2005). A Dicer é uma enzima essencial no mecanismo de RNAi, sendo responsável pelo tamanho do siRNA/miRNA formado. Proteínas Argonautas são componentes principais do complexo RISC, pois têm a função de se ligar ao miRNAs/siRNAs, selecionar qual das fitas do miRNA/siRNA permanece ligado ao RISC e possuem atividade de endonuclease que cliva os mRNAs complementares a estes siRNAs (Figura 2) (RIVAS et al., 2005; HÖCK; MEISTER, 2008).

**Figura 2.** Mecanismo de RNA interferente para as vias guiadas por siRNA e miRNA.



Autor: Antonin de Fougères et al. (2007).

Em teoria, qualquer mRNA de uma célula pode ser degradado de forma específica via RNAi. Outra característica do mecanismo de RNAi é seu caráter sistêmico, ou seja, após ser ativado em uma célula, um sinal é “transmitido” para as outras células. Este sinal sistêmico é um siRNA, pois além de ser pequeno e de fácil movimento, é a molécula que confere a especificidade ao mecanismo (MLOTSHWA et al., 2002). Entretanto, a sistematicidade do RNAi é menos evidente em alguns organismos eucariotos, a exemplo de muitas espécies de insetos nas quais o fenômeno não foi observado, tornando sua aplicação mais complexa (CHRISTIAENS; SMAGGHE, 2014).

Muitos avanços foram feitos desde a descoberta e elucidação do mecanismo de RNAi, e suas características permitem uma ampla adaptabilidade de uso desta técnica para o controle de pragas e patógenos (CAGLIARI et al., 2019). A especificidade da sequência do dsRNA permite a possibilidade do silenciamento de

genes que sejam críticos à sobrevivência do organismo alvo (WORRALL et al., 2019). Nesta tendência, a tecnologia de RNAi é uma das mais recentes abordagens no campo de controle de pragas e conceitualmente se aproxima do pesticida “ideal”: ele atinge apenas a praga alvo e possibilita um impacto mínimo sobre organismos não-alvo (polinizadores, parasitoides, predadores e vertebrados). Logo, o desenvolvimento de medidas de controle via RNAi torna possível a produção de um produto à base de dsRNA de aplicação tópica e/ou sistêmica, biodegradável e, portanto, com risco mínimo para a saúde humana e o meio ambiente (WHYARD et al., 2009; WANG et al., 2011; ANDRADE; HUNTER, 2016, 2017).

## 2.6 Estratégias de uso da tecnologia de RNAi

Numa abordagem transformativa, é possível desenvolver plantas transgênicas utilizando a tecnologia de RNAi. A primeira planta transgênica utilizando o mecanismo de RNAi para controle de doença foi um mamoeiro transgênico resistente ao *Papaya ringspot virus* (PRSV), causador da mancha anelar, liberada comercialmente no Hawaii, EUA em 1998 (SHEN et al., 2014; JIA et al., 2017). A resistência foi obtida mediante a expressão de um fragmento contendo a sequência parcial antisense do gene do capsídeo do vírus. Mais recentemente, o milho SmartStax PRO, desenvolvido pela Monsanto, foi a primeira planta comercial que utiliza a tecnologia de RNAi para controle de inseto, neste caso a *Diabrotica virgifera virgifera*. O SmartStax foi liberado para comercialização em 2016 no Brasil e Canadá e nos Estados Unidos em 2017 (HEAD et al., 2017).

A abordagem transformativa do RNAi é uma forma interessante de introduzir resistência em uma dada cultura de forma altamente específica, porém, este método enfrenta certas desvantagens ou limitações; estudos para liberação comercial de plantas transgênicas são caros e exigem adequações regulatórias que podem durar muitos anos. No Brasil, as atividades com transgênicos e biotecnologia são reguladas pela Lei 11.105/05. Um organismo geneticamente modificado (OGM) é obrigado a passar por muitos estudos que vai desde a caracterização molecular dos eventos até ensaios de segurança ambiental e de saúde humana, que podem durar até 20 anos de pesquisa (BRASIL, 2005). Além desses fatores, é dispendioso do ponto de vista prático criar um OGM para cada organismo alvo ou cultura.

Por outro lado, a utilização da tecnologia do RNAi por uma abordagem não transformativa tem se tornado alvo de grande interesse, tanto para pesquisa, quanto para fins comerciais, visto possibilitar o uso do RNAi em qualquer cultura. Neste caso, há a aplicação direta do dsRNA na planta, tanto via foliar ou aplicações no solo para absorção radicular, que passa a disseminar sistemicamente pela planta (HUNTER et al., 2012; ANDRADE; HUNTER, 2016). Este método é denominado de RNAi tópico, e vem sendo explorado para o controle de pragas (LI et al., 2015; KOCH et al., 2013; SAMMONS et al., 2015; ANDRADE 2016; ANDRADE; HUNTER, 2017).

Neste contexto, o dsRNA pode ser considerado como um ingrediente ativo para a formulação de inseticidas, fungicidas, produtos com ação antiviral, herbicidas etc., podendo ter diferentes modos de aplicação. Estes produtos baseados em dsRNA podem chegar ao mercado em quatro categorias: i) Agentes de controle direto; ii) Repressores de fatores de resistência (supressão de genes associados a resistência/tolerância a agroquímicos); iii) Disruptores de desenvolvimento (p. ex: supressão de genes envolvidos na produção de hormônios em insetos) e iv) Promotores de crescimento (supressão temporária de genes envolvidos no controle do florescimento em plantas) (US/EPA, 2013; US/EPA, 2014; ZOTTI; SMAGGHE, 2015; SAN MIGUEL; SCOTT, 2016; ANDRADE, 2016; ZOTTI et al., 2018).

É importante ressaltar que o uso do RNAi tópico para o controle de pragas deverá ser analisado caso a caso, visto que cada praga responde de forma variável ao RNAi. Por exemplo, *D. virgifera* é extremamente sensível à ingestão de dsRNA (LC<sub>50</sub> de 4,3 ng/mL) (BOLOGNESI et al. 2012; BACHMAN et al., 2013), enquanto lepidópteros em geral são recalcitrantes, sendo menos sensíveis à ingestão oral de dsRNA devido à presença de nucleases na saliva e trato digestivo que levam à degradação do dsRNA antes de ser absorvido pelas células do epitélio intestinal (TERENIUS et al., 2011; KATOCH; THAKUR, 2012; SHUKLA et al., 2016).

Outro ponto a ser considerado para que produtos à base de dsRNA sejam comercialmente viáveis na agricultura, é a produção destas moléculas em larga escala e baixo custo. Felizmente, tem-se observado acelerado aumento no conhecimento técnico-científico em diversas áreas relacionadas à tecnologia de RNAi, que estão solucionando estes gargalos. Corroborando com essa perspectiva, tem-se o Ledprona, primeiro produto pulverizável a base de dsRNA que foi

submetido a registro na Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA). O biopesticida é utilizado para o controle do besouro-da-batata, *Leptinotarsa decemlineata*. O dsRNA (dsPSMB5) utilizado tem como alvo a subunidade beta 5 do proteossomo (PSMB5), que faz parte da via ubiquitina-proteossoma, responsável pela degradação de proteínas danificadas e marcadas (“ubiquitinadas”). Em ensaios laboratoriais, foi observado 90% de mortalidade em ninfas de segundo instar após 6 dias de exposição à dose de  $25 \times 10^{-6}$ g/L do dsPSMB5 (RODRIGUES et al., 2021).

## **2.7 Considerações relevantes para a aplicação do RNAi no controle de pragas**

Um dos pontos chave para o funcionamento da tecnologia de RNAi no manejo de pragas é a identificação de genes que sejam essenciais ou críticos à sobrevivência do organismo-alvo (WANG et al., 2011). Outro ponto muito importante é como fazer a molécula de dsRNA adentrar as células do organismo-alvo para desencadear o mecanismo de RNAi. O processo de aquisição do dsRNA pelo organismo-alvo pode ocorrer de maneira direta ou indireta (CAGLIARI et al., 2019). A primeira ocorre quando a molécula de dsRNA é absorvida por contato direto ou por alimentação de tecidos da planta contendo o dsRNA em sua superfície (CAGLIARI et al., 2018). Pela forma indireta, as moléculas de dsRNA devem ser translocadas pelo sistema vascular das plantas, e então serem absorvidas pelo organismo-alvo. O processo de aquisição pelo organismo-alvo está fortemente relacionado com a estratégia de entrega, visto que cada organismo apresenta particularidades no seu modo de alimentação, refletindo na forma de aquisição do dsRNA (ANDRADE; HUNTER 2016; CAGLIARI et al., 2019).

O processo de definição das estratégias de entrega irá variar de acordo com o organismo alvo (localização da praga na planta, biologia da praga etc.) e cultura. Com base nestas variáveis, o dsRNA pode ser aplicado na superfície foliar, podendo permanecer aderido à epiderme ou ser absorvido pelas folhas e translocado pelo sistema vascular, por meio da injeção direta em troncos, bem como pela aplicação no solo para absorção do dsRNA pelas raízes (CAGLIARI et al., 2019). Entretanto, a aplicação direta do dsRNA pode não ser viável devido à instabilidade das moléculas de dsRNA diante das adversidades ambientais, principalmente a incidência de luz UV, remoção pela chuva ou mesmo degradação por microrganismos. Desta forma, aplicações de dsRNAs puro em campo podem

fornecer intervalos de proteção muito curtos, tornando a viabilidade prática questionável (PARKER et al., 2019).

Neste contexto, pesquisadores vêm estudando estratégias nanotecnológicas para a proteção de dsRNA. As nanocápsulas são reconhecidas atualmente como um dos principais veículos para transportar moléculas para terapia gênica (ABDELMAWLA et al., 2011). Elas envolvem a cobertura (*coating*) de dsRNA ou siRNA por substâncias como lipídeos, polímeros ou sua encapsulação em nanopartículas (SUTTON et al., 2006; CHEN; XIE, 2012). Zhang et al. (2010) encapsularam dsRNA homólogos ao gene da quitina sintase em nanopartículas de quitosana. Após fornecer as larvas de *Anopheles gambiae* via ingestão, os autores observaram os efeitos de RNAi nas larvas (redução da expressão gênica e conteúdo de quitina no corpo do inseto). Os pesquisadores ressaltaram que o dsRNA fornecido sem proteção da nanocápsula não resultou nos efeitos de RNAi, provavelmente porque houve a degradação do dsRNA por enzimas presentes no intestino da larva. É possível que além da proteção, a nanopartícula seja melhor absorvida pelas células da parede do intestino pela sua carga positiva (MITTER et al., 2017; WORRALL et al., 2019; ZHANG et al., 2010).

Mitter et al. (2017) demonstraram que o dsRNA pode ser protegido ao carregá-lo em nano-folhas de argila do tipo hidróxido duplo lamelar (HDL, Layered Double Hydroxide) não-tóxicas e biodegradáveis. As nano-folhas de HDL são capazes de carregar grandes quantidades de dsRNA, e o complexo dsRNA-HDL é chamado de BioClay. Plantas de *Nicotiana tabacum* foram pulverizadas com soluções contendo moléculas de dsRNA-HDL. O dsRNA protegido pôde ser detectado até 30 dias após aplicação. Uma única aplicação foi capaz de proteger as plantas por pelo menos 20 dias contra o *Pepper mild mottle virus* (PMMoV). Esta é uma alternativa eficiente que promete romper as barreiras que limitam o uso da tecnologia do RNAi para proteção agrícola.

## 2.8 Métodos de aplicação de produtos contendo dsRNA

**Aplicação foliar:** A pulverização foliar pode ser uma alternativa de entrega das moléculas de dsRNA para as pragas que se alimentam e crescem na filosfera (CAGLIARI et al., 2019). Produtos formulados à base de dsRNA atuam como os pesticidas sintéticos de aplicação local, porém, com uma vida útil mais curta, devido às características químicas do dsRNA. Diversos estudos explorando essa

estratégia de entrega apresentaram resultados significativos no controle de insetos. Gong et al. (2013) conseguiram índices de até 60% de mortalidade após alimentarem larvas de *Plutella xylostella* com folhas de *Brassica* spp. pulverizadas com siRNAs. San Miguel e Scott (2016) demonstraram, em condições de casa de vegetação, que moléculas de dsRNA podem permanecer estáveis por até 28 dias, além de obterem resultados significativos para o controle de *Leptinotarsa decemlineata*. Andrade e Hunter (2016) testaram a aplicação foliar para *Diaprepes abbreviatus*, e a técnica se mostrou promissora para o controle desses insetos. A aplicação também se mostrou eficiente para o manejo de patógenos. Wang et al. (2017), aplicaram moléculas de siRNAs e dsRNA em frutas, vegetais e flores, e conseguiram inibir o desenvolvimento do fungo *Botrytis cinerea* por até dez dias. Eles também testaram a especificidade dos dsRNAs; aplicaram as mesmas moléculas contra o fungo *Verticillium dahlia*, e não obtiveram nenhum efeito de controle.

**Injeção em tronco:** Este método de entrega de dsRNA é especialmente adequado para plantas perenes. As moléculas de RNA são injetadas diretamente no sistema vascular das plantas, por onde podem ser translocadas para outros tecidos da planta. Hunter et al. (2012) injetaram solução de dsRNA em plantas de videira e citros, e foi possível detectar a molécula até sete semanas após a aplicação. Também foi constatada a supressão do desenvolvimento de insetos, como o psilídeo dos citros, *D. citri*.

**Irrigação:** Esse método para entrega de moléculas de dsRNA é uma boa alternativa para culturas irrigadas. Atualmente, a irrigação por gotejamento é mais utilizada em muitas culturas devido seu potencial de economizar água e nutrientes. A técnica permite que a água goteje lentamente para as raízes das plantas. Incorporar dsRNA à água de irrigação permitiria um suplemento contínuo dessas moléculas ao solo, de onde seriam absorvidas pelas raízes das plantas. Li et al. (2015) obtiveram até 50% de mortalidade para ninfas de *Nilaparvata lugens*, após imersão de raízes de arroz em soluções contendo dsRNA. Neste mesmo trabalho, também obtiveram altas taxas de mortalidade para larvas de *Ostrinia furnacalis*, após se alimentarem de mudas de milho que foram irrigadas com solução de dsRNA.



## 2.9 Aspectos ambientais: acúmulo de dsRNA no solo

O tempo de permanência que as moléculas de dsRNA podem permanecer no ambiente é uma das questões que intrigam os pesquisadores da tecnologia do RNAi, seja pela potencialidade de risco ambiental ou pela aplicabilidade da tecnologia (PARKER et al., 2019; ZANG et al., 2020). Naturalmente, é possível encontrar grandes quantidades de ácido nucleico em uma amostra de solo biologicamente ativo. Há uma suplementação contínua destas moléculas, que pode ocorrer por extrusão passiva ou ativa durante o crescimento de microrganismos ou mesmo por morte ou lise celular (PIETRAMELLARA et al., 2009; PARKER; SANDER, 2017).

Apesar do aporte contínuo, não há evidências que demonstrem o acúmulo de DNA ou RNA em solo. Os dados apontam para uma direção contrária; a alta suscetibilidade destas moléculas a processos ambientais. Após aplicação, o dsRNA está sujeito à diluição, (bio)degradação e adsorção em partículas do solo (PARKER; SANDER, 2017; PARKER et al., 2019). Estes processos podem rapidamente reduzir os níveis de concentração do dsRNA, e são influenciados pelas características biológicas, físicas e químicas do solo (ZANG et al., 2020).

Os solos cultiváveis são amplamente heterogêneos com complexidade química variável, e que apresentam diversas partículas (areia, argila, silte e substâncias húmicas) que podem interagir com os ácidos nucleicos em um processo de adsorção (PIETRAMELLARA et al., 2009; PARKER; SANDER, 2017). Dubelman et al. (2014) testaram três diferentes tipos de solo e diferentes concentrações de dsRNA, observando que a rápida degradação das moléculas independe do tipo de solo e das concentrações testadas, e não foi possível detectar as moléculas após 36 h após de aplicação.

Entretanto, Zhang et al. (2020) conseguiram demonstrar que é possível detectar o dsRNA em dois diferentes tipos solo 72 h após aplicação. Apesar da maior durabilidade, é possível observar que há uma alta taxa de degradação ou redução da concentração do dsRNA nas primeiras 16 horas após aplicação. Esta alta suscetibilidade à dissipação independe até mesmo de atividade microbiológica. Parker et al. (2019) observaram que mesmo em solos com baixa atividade microbiana, houve uma alta taxa de degradação do dsRNA após 24 horas de incubação. Não obstante, foi possível constatar que em solos com alta atividade

microbiana, estes organismos são capazes de utilizar o dsRNA ou o produto de sua degradação para a síntese de produtos de alto peso molecular.

Tendo isto em vista, o que se observa é que o RNAi apresenta um risco ambiental baixo, seja pela especificidade da sequência da molécula ou por estar naturalmente presente no ambiente e em todos os organismos (ácidos nucleicos) (PARKER et al., 2019; ZANG et al., 2020). Por outro lado, a alta suscetibilidade do dsRNA às condições ambientais se torna um dos principais desafios para utilização desta tecnologia. Neste sentido, o que vem sendo buscado é o desenvolvimento de estratégias que promovam maior estabilidade do dsRNA, permitindo assim prolongar sua integridade no ambiente e sua absorção pelas células do organismo alvo, a fim de conferir maior viabilidade e tempo de proteção às culturas agrícolas (MITTER et al., 2017).

### 3. REFERÊNCIAS

ABDELMAWLA S. et al. Pharmacological characterization of chemically synthesized monomeric phi29 pRNA nanoparticles for systemic delivery. **Molecular Therapy**, v. 19, n. 7, p. 1312–1322, 2011.

ACHMAN, P. M. et al. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). **Transgenic Research**, v. 22, n. 6, p. 1207-1222, 2013.

AKSENOV, A. A. et al. Synthetic blends of volatile, phytopathogen-induced odorants can be used to manipulate vector behavior. **Ecology and Evolution**, v. 2, n.9 p. 1-9, 2014.

ALQUÉZAR, B. et al.  $\beta$ -caryophyllene emitted from a transgenic *Arabidopsis* or chemical dispenser repels *Diaphorina citri*, vector of *Candidatus Liberibacter*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 5639, p. 1-9, 2017.

AMMAR, EL-D. et a. Stylet morphometrics and citrus leaf vein structure in relation to feeding behavior of the asian citrus psyllid *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing bacterium. **Plos One**, v. 8, n.3, p. 1-12, 2013.

AMORÓS, M. E. et al. Response of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) to volatiles characteristic of preferred citrus hosts. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 13, n. 3, p. 367-374, 2019.

ANDRADE, E. C. Genetic strategies for weed control - emphasis on RNA interference. In: Dana Katia Meschede; Dionisio Luiz Pisa Gazzieiro. (Org.). **A era glyphosate: agricultura, meio ambiente e homem**. 1 ed. Londrina: Midiograf II, v. 1, n. 1, p. 155-165, 2016.

ANDRADE, E. C.; HUNTER, W. B. RNA Interference – natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC). **InTech**, v. 1, n. 3, p. 391-409, 2016.

ANDRADE, E. C.; HUNTER, W. B. RNAi Feeding bioassay: development of a non-transgenic approach to control asian citrus psyllid and other hemipterans. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 2, n. 3, p. 389-396, 2017.

AUBERT, B. Citrus greening disease, a serious limiting factor for citriculture in Asia and Africa. International Society of Citriculture, **Proceedings**, v.2, n. 1, p. 817–820, 1992.

BALDIN, E. L. L.; VENDRAMIM, J. D.; LOURENÇÃO, A. L. **Resistência de plantas a insetos: fundamentos e aplicações**. Piracicaba: Fealq, p. 493, 2019.

BARROS, J. R. M. et al. O mercado da citricultura no Brasil e nas suas novas perspectivas. **CITRUSBR**, 34 p. 2016.

BASSANEZI, R. B. et al. Effects of Huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.125, n. 8, p. 565-572, 2009.

BASSANEZI, R. B. et al. Overview of citrus Huanglongbing spread and management strategies in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, n.18, p. 251-264, 2020.

BASTOS, D. C.; et al. Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuário**, v.35, n. 281, p.36-45, 2014.

BAUM, J. A. et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1322-1326, 2007.

BELASQUE JR. et al. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas de assintomáticas de Huanglongbing (HLB, greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n. 3, p. 137-145, 2009.

BOINA, D. R. et al. Quantifying dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae) by immune marking and potential impact of unmanaged groves on commercial citrus management. **Environmental Entomology**, v. 38, n. 4, p. 1250-1258, 2009.

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. e47534, 2012.

BOVÉ, JOSEPH-MARIE. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006.

BRASIL. **Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005**. 184º da Independência e 117º da República.

CAGLIARI, D. et al. Management of Pest Insects and Plant Diseases by Non-Transformative RNAi. **Plant Science**, v. 10, n. 1319, p. 1-18, 2019.

CAGLIARI, D. et al. "Modulating Gene Expression - Abridging the RNAi and CRISPR-Cas9 Technologies," in Nontransformative Strategies for RNAi in Crop Protection. Eds. A. Singh and M. W. Khan (London, UK: **IntechOpen**), p.1–18, 2018.

CARMELL, M. A. et al. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 16, n. 21, p. 2733-2742, 2002.

CASTRO M. E. A. et al. Situação e ações do estado de Minas Gerais frente ao Huanglongbing. **Citrus Research Technology**, v. 31, n. 2, p. 163–168, 2010.

CEN, Y. et al. Feeding behaviour of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy and Huanglongbing-infected citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 143, n. 1, p. 13–22, 2012.

CHAREONVIRIYAPHAP, T. et al. Review of insecticide resistance and behavioural avoidance of vectors of human diseases in Thailand. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 280, p. 280, 2013.

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

CHAVEZ, Y. et al. *Tamarixia radiata* (Waterston) and *Cheilomenes sexmaculata* (Fabricius) as biological control agents of *Diaphorina citri* Kuwayama in Ecuador. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 77, n. 2, p. 180-184, 2017.

CHEN, J.; XIE, J. Progress on RNAi-based molecular medicines. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, n. 1, p. 3971-3980, 2012.

CHRISTIAENS, O.; SMAGGHE, G. The challenge of RNAi-mediated control of hemipterans. **Current Opinion in Insect Science**, v. 6, n. 1, p. 15-21, 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. 1382-1382, 2004.

COLETTA-FILHO, H. D. et al. In planta multiplication and graft transmission of *'Candidatus Liberibacter asiaticus'* revealed by real-time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, n. 1, p. 53-60, 2010.

CDA - COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Dados da citricultura paulista**. 2019. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/gdsv/index.php?action=dadosCitriculturaPaulista>>. Acesso em: 31 mar. 2021.

COSTA LIMA, A.M. **Insetos do Brasil**. Tomo 3º, Homópteros. Escola Nacional de Agronomia, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 324 p. 1942.

DA GRAÇA, J.V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, n. 1, p. 109-136, 1991.

DALA-PAULA et al. Effect of huanglongbing or greening disease on orange juice quality, a review. **Plant Science**, v. 9, n. 33, p. 1-19, 2019.

DANG, K. et al. Insecticide resistance and resistance mechanisms in bed bugs, *Cimex* spp. (Hemiptera: Cimicidae). **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 318, p. 1-31, 2017.

DAVIS, T. S. et al. Experimental infection of plants with an herbivore-associated bacterial endosymbiont influences herbivore host selection behavior. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49330, 2012.

DE FOUGEROLLES A, et al. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 443-53, 2007.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Instrução Normativa N° 26, de 10 de setembro de 2019, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brasil**, 2019.

DONADIO, L. C. et al. Tangerinas ou mandarinas. **Boletim Citrícola**. Jaboticabal: Funep, 40 p. 1998.

DUBELMAN, S. et al. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e93155, 2014.

EBERT, T. A. et al. Behavioral plasticity in probing by *Diaphorina citri* (Hemiptera, Liviidae): ingestion from phloem versus xylem is influenced by leaf age and surface. **Springer**, v. 31, n. 2, p. 1-19, 2018.

ETXEBERRIA, E. et al. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.74, n. 1, p. 76-83, 2009.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Compare Data**, 2020. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#compare>>. Acesso em: 10 dez. 2021.

FIRE, A. Z. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FIRE, A. Z. Gene silencing by double-stranded RNA. **Angewandte Chemie**, v. 46, n. 36, p. 6966-6984, 2007.

FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura). Brotações diminuem dispersão do psilídeo no pomar. **Citricultor**, v. 5, p. 6-7, 2013. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/revistas>>. Acesso em: 30 mar. 2021.

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

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

FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura). **Manejo do greening: 10 mandamentos para o sucesso no controle da doença**. Araraquara: São Paulo, 64p. 2019.

FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura). **Situação do greening no cinturão citrícola de São Paulo e Sul/Sudoeste de Minas Gerais em 2021 e ações de manejo**. São Paulo: São Paulo: Fundo de Defesa da Citricultura, 42p. 2021.

GARNIER, M. et al. Etiology of citrus greening disease. **Annales de Microbiologie**, v.153, n. 1 p. 169-179, 1984.

GATTON, M. L. et al. The importance of mosquito behavioural adaptations To Malaria Control In Africa. **Evolution**, v. 67, n. 4, p. 1218-1230, 2013.

GEORGHIOU, G.P. The evolution of resistance to pesticides. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 3, n. 1, p.133–68, 1972.

GONG, L. et al. Testing insecticidal activity of novel chemically synthesized siRNA against *Plutella xylostella* under laboratory and field conditions. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. 1-8, 2013.

GOTTWALD, T. R. et al. Citrus huanglongbing: the pathogen, its epidemiology, and impact. *Plant Healthy Progress*, 2007. Online. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2007/huanglongbing/>>. Acesso em: 31 mar. 2021.

GOULIN, E. H. et al. RNA interference and CRISPR: Promising approaches to better understand and control citrus pathogens. **Microbiological Research**, v. 226, n. 1016, p. 1–9, 2019.

GRAHAM, J. et al. Presymptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by Huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. **Plant Disease Journal**, v. 97, n. 9, p.1195–1199, 2013.

HALBERT, S. E. et al. Incidence of Huanglongbing-associated ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) collected from Plants for Sale in Florida. **Florida Entomologist**, v.95, n. 3, p. 617-624, 2012.

HALBERT, S. E.; MANJUNATH, K. L. Asian citrus psyllids (sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in florida. **Florida Entomologist**, v.87, n. 3, p. 330-353, 2004.

HALL, D. G. et al. Behavioral assay on asian citrus psyllid attraction to orange jasmine. **Springer**, v. 28, n. 5, p. 555-568, 2015.

HEAD, G. P. et al. Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. **Pest Management Science**, v. 73, n. 9, p. 1883-1899, 2017.

HIJAZ, F. et al. Possible role of plant volatiles in tolerance against huanglongbing in citrus. **Plant Signaling & Behavior**, v. 11, n. 3, p. 1-12, 2016.

HÖCK, J.; MEISTER, G. The Argonaute protein family. **Genome Biology**, v. 9, n. 210, p. 1-8, 2008.

HOLLIS, D. A new citrus-feeding psyllid from the Comoro Islands, with a review of the *Diaphorina amoena* species group (Homoptera). **Systematic Entomology**, v.12, n. 1, p. 47–61, 1987.

HUNG, T. H. et al. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. **Plant Pathology**, v. 53, n. 1, p. 96–102, 2004.

HUNG, Y-H.; SLOTKIN, R. K. The initiation of RNA interference (RNAi) in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 61, n. 1, p.102014, 2021.

HUNTER, W. B. et al. Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression. **Southwestern Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 85-87, 2012.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) – SIDRA. **Produção agrícola municipal**, 2020. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>>. Acesso em: 10 dez. 2021.

IQBAL, J. et al. A field study investigating the insecticidal efficacy against *Diaphorina citri* Kuwayama on Kinnow mandarin, *Citrus reticulata* Blanco trees. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 5, p. 1237-1241, 2020.

JAGOUEIX, S. et al. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of a subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.44, n. 3, p. 397-486, 1994.

JIA, R. et al. Use of RNAi technology to develop a PRSV-resistant transgenic papaya. **Scientific Reports**, v. 7, n. 12636, p. 1-9, 2017.

KATOCH, R.; THAKUR, N. Insect gut nucleases: a challenge for RNA interference mediated insect control strategies. **International Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, n. 8, p. 198-203, 2012.

KEREMANE, M.L. et al. Report of *Candidatus Liberibacter caribbeanus*, a new citrus- and psyllid-associated *Liberibacter* from Colombia, South America. **American Phytopathological Society**. 2015. Acesso: 12 Jan. 2022. [https://www.apsnet.org/meetings/Documents/2015\\_meeting\\_abstracts/aps2015abO253.htm](https://www.apsnet.org/meetings/Documents/2015_meeting_abstracts/aps2015abO253.htm)

KILLEEN, G. F.; CHITNIS, N. Potential causes and consequences of behavioural resilience and resistance in malaria vector populations: a mathematical modelling analysis. **Malaria Journal**, v. 13, n. 97, p. 97, 2014.

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

KOCH, A. et al. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 10, p. e1005901, 2016.



- KOCH, A. et al. Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14-demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 48, p. 19324-19329, 2013.
- KOST, C.; HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. **Journal of Ecology**, v. 94, n. 3, p. 619–628, 2006.
- LARA, F.M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Ícone, p. 336, 1991.
- LI, H. et al. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, n. 11, p. 2277-2285, 2015.
- 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. 1, p. 201–206, 2000.
- LOCKWOOD, J.A.; SPARKS, T.C.; SORY, R.N. Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 30, n. 4, p. 41–51, 1984.
- LOPES, S. A. et al. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. **European Journal of Plant Pathology**, v.119, n. 1, p.463-468, 2007.
- LOPES, S. A. et al. Limited success of heat treatments for curing HLB affected trees. **Journal of Citrus Pathology**, v. 1, n. 3, p. 201, 2014.
- 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, p. 1-13, 2012.
- MAO, YING-BO et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1307–1313, 2007.
- MARTINI, X. et al. Progress toward an attract-and-kill device for Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) using volatile signatures of citrus infected with huanglongbing as the attractant. **Journal of Insect Science**, v. 20, n. 6, p. 1-10, 2020.
- MAUCK, K. E. et al. Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 8, p. 3600–3605, 2010.
- MEAD, F.W.; FASULO, T. R. **Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Insecta: Hemiptera: Psyllidae)**. Gainesville, University of Florida (IFAS Extension, 33). 8 p. 2011.

MEN, X. et al. Behavioral response of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to cotton with and without expression of the CryIAc  $\delta$ -Endotoxin protein of *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Journal of Insect Behavior**, v. 18, n. 1, p. 33-50, 2005.

MENEGUIM, L. et al. Ocorrência de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' agente causal do huanglongbing no estado do Paraná. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 100, 2008.

MICHAUD, J. P. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. **Biological Control**, v. 29, n. 3, p. 260-269, 2004.

MITTER, N. et al. Induction of virus resistance by exogenous application of double-stranded RNA. **Current Opinion in Virology**, v. 26, n. 1, p. 49-55, 2017.

MLOTSHWA, S. et al. RNA silencing and the mobile silencing signal. **The plant Cell**, v. 14, n. 1, p. 289-301, 2002.

MORRIS, K. V. et al. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. **Science**, v. 305, n. 5688, p. 1289-1292, 2004.

MURRAY, R. G. E.; SCHLEIFER, K. H. Taxonomics notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, n. 1, p. 174-176, 1994.

NAEEN, A. et al. First report of thiamethoxam resistance selection, cross resistance to various insecticides and realized heritability in Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* from Pakistan. **Crop Protection**, v. 121, n. 1, p. 11-17, 2019.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 279-89, 1990.

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

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

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. N. **CITRICULTURA 2017**. São Paulo: CitrusBR. 60 p. 2017.

PAINTER, R.T. L. Insect Resistance in Crop Plants. **Soil Science**, v. 72, n. 1, p. 481, 1951.

PARKER, K. M. et al. Environmental fate of RNA interference pesticides: adsorption and degradation of double-stranded RNA molecules in agricultural soils. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 6, p. 3027-3036, 2019.

PARKER, K. M.; SANDER, M. Environmental fate of insecticidal plant-incorporated protectants from genetically modified crops: Knowledge gaps and research opportunities. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 21, p. 12049-12057, 2017.

PARRA, J. R. P. et al. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao Huanglongbing. **Citrus Research and Technology**, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2010.

PATT, J. M. et al. Multimodal cues drive host-plant assessment in asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*). **Environmental Entomology**, v. 40, n. 6, p. 1494-1502, 2011.

PELZ-STELINSKI, K. S. et al. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Economical Entomology**, v. 103, n. 5, p. 1531-1541, 2010.

PIETRAMELLARA, G. et al. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, n. 1, p. 219-235, 2009.

PORTALANZA, D. E. et al. First records of parasitoids attacking the asian citrus psyllid in Ecuador. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 61, n. 2, p. 107-110, 2017.

QURESHI, J. A. et al. Insecticidal Suppression of Asian Citrus Psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) Vector of Huanglongbing Pathogens. **Plos One**, v. 9, n. 12, p. 1-22, 2014.

RAITHORE, S. et al. Effect of blending Huanglongbing (HLB) disease affected orange juice with juice from healthy orange on flavor quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 868–874, 2015.

RAJA, M.A.G.; KATAS, H.; AMJAD, M.W. Design, mechanism, delivery and therapeutics of canonical and Dicer-substrate siRNA. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 5, p. 497–510, 2019.

RAMADUGU, C. et al. Long-term field evaluation reveals Huanglongbing resistance in *Citrus* relatives. **Plant Disease**, v. 100, n. 9, p. 1858-1859, 2016.

RIVAS, F. V. et al. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 4, p. 340-349, 2005.

RODRIGUES, T. B. et al. First Sprayable Double-Stranded RNA-Based Biopesticide Product Targets Proteasome Subunit Beta Type-5 in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). **Plant Science**. v. 12, n. 728652, p. 1-15, 2021.

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

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

RUAN, C-Q. et al. Host-Choice behavior of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) under laboratory conditions. **Springer**, v. 28, n. 2, p. 138-146, 2015.

RUIZ-GALVÁN, I. et al. Control químico de *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae) en Lima Persa. **Acta Zoológica Mexicana**, v. 31, n. 1, p. 41-47, 2015.

SAMMONS, R. D. et al. Method for controlling herbicide-resistant plants, US9121022, 1. Set. 2015. **Google Patents**.

SAN MIGUEL, K.; SCOTT, J. G. The next generation of insecticides: DsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. **Pest Management Science**, v. 72, n. 4, p. 801-809, 2016.

SECHLER, A. et al. Cultivation of *Candidatus L. africanus* and '*Candidatus L. americanus*' associated with Huanglongbing. **Phytopathology**, v. 99, n. 5, p. 480-486, 2009.

SHEN, W. et al. Resistance of non-transgenic papaya plants to *papaya ringspot virus* (PRSV) mediated by intron-containing hairpin dsRNAs expressed in bacteria. **Acta Virologica**, v. 58, n. 3, p. 261-266, 2014.

SHUKLA, J. N. et al. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. **RNA Biology**, v. 13, n. 7, p. 656-669, 2016

SILVA, J.S. et al. RNA interferente no controle de pragas. In: SOARES, A.C.F. et al. **Tópicos em microbiologia agrícola**. Cruz das Almas: Ufrb, v. 1, n. 1, p.135-156, 2020.

SILVA, J.S. et al. RNAi Feeding Bioassay: A Protocol for dsRNA Screening Against Asian Citrus Psyllid and Related Hemipteran Insects. **Methods in Molecular Biology**. v. 2360, n. 1, p.85-90, 2022.

SINGERMAN, A. et al. Is area-wide pest management useful? The case of citrus greening. **Applied Economic Perspectives and Policy**, v. 39, n. 4, p. 609-634, 2017.

SMITH, C. M. **Plant resistance to arthropods: molecular and conventional approaches**. Springer, p. 243, 2005.

SOKHNA, C.; NDIATH, M. O.; ROGIER, C. The changes in mosquito vector behaviour and the emerging resistance to insecticides will challenge the decline of malaria. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 10, p. 902-907, 2013.

SPANN, T. M. et al. IFAS guidance for huanglongbing (greening) management. **Citrus Industry**, V. 91, n. 1, p. 6-13, 2010.

SUTTON, D. et al. Efficient suppression of secretory clusterin levels by polymer-siRNA nanocomplexes enhances ionizing radiation lethality in human MCF-7 breast cancer cells in vitro. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 2, p. 155-162, 2006.

TANING, C. N. T. et al. Asian Citrus Psyllid RNAi Pathway – RNAi evidence. **Scientific Reports**, v. 6, n. 38082, p. 1-10, 2016.

TEIXAIRA, D. C. et al. '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, n. 5, p. 1857-1862, 2005.

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.

TOFANGSAZI, N. et al. Residual toxicity of selected organic insecticides to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and non-target effects on *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in California. **Crop Protection**, v. 108, n. 1, p. 62-70, 2018.

TOMARI, Y.; ZAMORE, P. D. Perspective: machines for RNAi. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 19, n. 5, p. 517-529, 2005.

TSAI, J. H. et al. Seasonal abundance of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Southern Florida. **Florida Entomologist**, v. 85, n. 3, p. 446–451, 2002.

US/EPA. **Environment protection agency, RNAi technology as a pesticide: Problem formulation for human health and ecological risk assessment**. 2013. Disponível em: <http://www.thecre.com/premium/wpcontent/uploads/2012/04/RNAi-White-Paper.pdf>.

US/EPA. **Environment protection agency, RNAi technology as a pesticide: problem formulation for human health and ecological risk assessment**. 2014. Disponível em: <http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/012814minutes.pdf>.

USDA (United States Department of Agriculture). **Citrus: World Markets and Trade**. Global Agricultural Outlook Board. 13 p. 2020.

VASHISTH, T.; LIVINGSTON, T. Assessment of pruning and controlled-release fertilizer to rejuvenate huanglongbing-affected sweet orange. **HortTechnology**, v. 29, n. 6, p. 933-940, 2019.

VOLPE, H. XL. Efficacy of essential oil of *Piper aduncum* against nymphs and adults of *Diaphorina citri*. **Pest Management Science**, v. 72, n. 6, p. 1242-1249, 2015.

WADA-KATSUMATA A.; SILVERMAN J.; SCHAL, C. Changes in taste neurons support the emergence of an adaptive behaviour in cockroaches. **Science**, v. 340, n. 6135, p. 972–5, 2013.

WANG, M.; THOMAS, N.; JIN, H. Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre- and post-harvest plant protection. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 38, n. 1, p. 133-141, 2017.

WANG, Y. et al. Second-generation sequencing supply an effective way to screen rna targets in large scale for potential application in pest insect control. **Plos One**, v. 6, n. 4, p. 1-10, 2011.

WENNINGER, E. J.; HALL, D. G. Daily and seasonal patterns in abdominal color in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 101, n. 3, p. 585-592, 2008.

WHYARD, S.; SINGH, A. D.; WONG, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. **Elsevier**, v. 39, n. 11, p. 824-832, 2009.

WORRALL, E. A. et al. Exogenous application of RNAi-inducing double-stranded RNA inhibits aphid-mediated transmission of a plant virus. **Plant Science**, v. 10, n. 265, p. 1-9, 2019.

YAMAMOTO, P. T. et al. Eficácia de Inseticidas para o Manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: psyllidae) em Citros. **Sociedade Entomológica do Brasil**, v.4, n. 3, p. 1-9, 2009.

YAMAMOTO, P. T. et al. Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 165-170, 2001.

YI, R.; QIN, Y.; CULLEN, B.R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-micro RNAs and short hairpin RNAs. **Genes & Development**, v. 17, n. 24, p. 3011-3016, 2003.

ZALUCKI, M. P.; FURLONG, M. J. Behavior as a mechanism of insecticide resistance: evaluation of the evidence. **Current Opinion in Insect Science**, v. 21, n. 1, p. 19-25, 2017.

ZHANG, J. H. et al. Feeding behaviour of *Helicoverpa armigera* larvae on insect-resistant transgenic cotton and non-transgenic cotton. **Journal of Applied Entomology**, v. 128, n. 3, p. 218-225, 2004.

ZHANG, K. et al. Analysis of RNA interference (RNAi) biopesticides: Double-stranded RNA (dsRNA) extraction from agricultural soils and quantification by RT-qPCR. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 8, p. 4893-4902, 2020.

ZHANG, L-H. et al. Effects of cold storage on the fitness of *Tamarixia radiata*, a dominant parasitoid of Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*. **Crop Protection**, v. 11, n.10, p. 1-9, 2020.

ZHANG, X.; ZHANG, J.; ZHU, K.Y. Chitosan/doublestranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). **Insect Molecular Biology**, v. 19, n. 5, p. 683-693, 2010.

ZHAO, D. et al. Oviposition and feeding avoidance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) against transgenic Bt cotton. **Journal of Applied Entomology**, v. 140, n. 9, p. 715-724, 2016.

ZOTTI, M. J. et al. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. **Society of Chemical Industry**, v. 74, n. 6, p. 1239-1250, 2018.

ZOTTI, M. J.; SMAGGHE, G. 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, 2015.

## CAPÍTULO 1

### Preferência de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) em brotações de citros tratadas com dsRNAs

**RESUMO:** O potencial da tecnologia do RNA interferente (RNAi) para o controle do psilídeo dos citros, *Diaphorina citri*, vetor do Huanglongbing (HLB), tem sido demonstrado em diferentes publicações. RNAi é um mecanismo biológico natural que regula, de forma específica, a expressão de um gene, e pode ser utilizado como uma abordagem ambientalmente sustentável e eficiente no controle de insetos. O presente trabalho buscou entender se plantas tratadas com RNA de fita dupla (dsRNA) podem induzir alguma resposta de resistência comportamental ao psilídeo. Para avaliar a sensibilidade do psilídeo à presença do dsRNA em plantas, foi realizada uma série de experimentos de livre escolha para observar a resposta de seleção do inseto entre plantas tratadas e não tratadas com dsRNAs homólogos (dsRNA-AK; dsRNA-Trehal) e não-homólogo (dsRNA-GFP) a genes do psilídeo. Foram realizados cinco experimentos: (i) dsRNA-AK vs Água, (ii) dsRNA-GFP vs Água, (iii) dsRNA-GFP vs dsRNA-Trehal, (iv) dsRNA-AK vs dsRNA-Trehal, e (v) um experimento controle, contendo apenas brotações tratadas com água. Quatro suportes (rack) com quatro brotações cada (duas de cada tratamento) foram introduzidas em gaiola entomológica e, no centro, foram liberados 50 psilídeos. O experimento foi observado durante 10 dias, e o número de insetos vivos em cada brotação foi contabilizado diariamente. Cada experimento foi repetido ao menos 4 vezes. De acordo com o teste F da análise de variância ( $p < 0,05$ ), a presença das moléculas de dsRNA nas brotações de citros não alterou o comportamento de *D. citri* na seleção de hospedeiro, não havendo uma resposta de resistência comportamental dos insetos. Além disso, nos ensaios que continham brotações tratadas com dsRNAs específicos (dsRNA-AK vs dsRNA-Trehal) ao psilídeo, foi observada elevada mortalidade quando comparado a ensaios que continham brotações tratadas apenas com água, corroborando com outros trabalhos que demonstram que a tecnologia de RNAi tem potencial para o controle do psilídeo.

**Palavras chave:** Psilídeo, Huanglongbing, RNA interferente, Citricultura



## Preference of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus flush treated with dsRNA

**ABSTRACT:** The potential of RNA interference (RNAi) technology to control the citrus psyllid, *Diaphorina citri*, the Huanglongbing vector (HLB), has been demonstrated in different publications. RNAi is a natural biological mechanism that specifically regulates gene expression and could be used as an environmentally sustainable and efficient approach to insect control. The present work sought to understand whether plants treated with double-stranded RNA (dsRNA) can induce some behavioral response of resistance to psyllid. To assess the sensitivity of psyllid to the presence of dsRNA in plants, a series of free-choice experiments were performed to observe the insect selection response between plants treated with dsRNAs homologous (dsRNA-AK; ds RNA-Trehal) and non-homologous (ds RNA-GFP) to psyllid genes and untreated. Five experiments were performed: (i) dsAK vs Water, (ii) ds RNA-GFP vs Water, (iii) ds RNA-GFP vs ds RNA-Trehal, (iv) ds RNA-AK vs ds RNA-Trehal, and (v) a control experiment containing only water treated shoots. Four racks with four shoots each (two from each treatment) were placed into an entomological cage and, in the center, 50 psyllids were released. The experiment was observed for 10 days, and the number of live insects on each shoot was recorded daily. Each experiment was repeated at least four times. According to the analysis of variance F test ( $p < 0.05$ ), the presence of dsRNA molecules in citrus shoots did not change *D. citri* behavior in host selection, with no behavioral response of insect resistance. In addition, in assays that contained shoots treated with psyllid-specific dsRNAs (dsAK vs dsTrehal) high mortality was observed compared to assays that contained shoots treated only with water, corroborating other studies that demonstrate that RNAi technology has the potential for psyllid control.

**Key words:** Psyllid, Huanglongbing, RNA interference, Citriculture

## 1. INTRODUÇÃO

A citricultura é um dos setores de grande importância da agricultura. Em 2019, a produção mundial de laranja alcançou valores aproximados de 74,7 milhões de toneladas. O Brasil se destaca dentre principais produtores de citros, e neste mesmo ano, contribuiu com cerca de 21,7% da produção global (FAO, 2020; USDA, 2021). Assim como outros setores, a citricultura enfrenta uma série de problemas fitossanitários que limitam sua produção. Devido às dificuldades de controle e impacto econômico causado, o Huanglongbing (HLB) ou Greening dos citros é considerada a mais devastadora doença da citricultura mundial (BOVÉ, 2006; CHAVEZ et al., 2017).

O HLB é causado por bactérias gram-negativas pertencentes ao gênero *Candidatus Liberibacter* (Ca. L.), existindo quatro espécies: *Ca. Liberibacter asiaticus* (Ca. Las), *Ca. Liberibacter africanus* (Ca. Laf), *Ca. Liberibacter americanus* (Ca. Lam) e *Ca. Liberibacter caribbeanus* (Ca. Lca) (GARNIER et al., 1984; TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006; KEREMANE et al., 2015). Em campo, o HLB pode ser transmitido por duas espécies de psílídeos; *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Hemiptera; Psyllidae) e *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera; Psyllidae) (GARNIER et al., 1984; HALBERT; MANJUNATH, 2004; BOVÉ, 2006). Contudo, *D. citri* é considerado o principal vetor do HLB devido a sua ampla distribuição nos principais centros de produção citrícola na Ásia e América (TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006; CHAVEZ et al., 2017).

O controle de *D. citri* é baseado no uso de pesticidas químicos sintéticos. Os produtores dispõem de uma variedade destes agentes químicos, sejam de ação de contato ou sistêmicos. Entretanto, a baixa seletividade destes agroquímicos promove o aumento do custo ambiental, uma vez que pode eliminar a fauna benéfica ou favorecer a seleção de populações resistentes do inseto. Diversos estudos têm demonstrado múltiplos mecanismos associados a resistência de insetos a diferentes classes de inseticidas (QURESHI et al., 2014; TOFANGSAZI et al., 2018; NAEEN et al., 2019).

Neste sentido, há a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias de controle que sejam eficientes e ambientalmente sustentáveis. Estratégias para proteção de culturas utilizando vias genéticas vêm sendo estudadas ao longo dos últimos anos e se mostram altamente promissoras, a exemplo do mecanismo de RNA interferente (RNAi). O RNAi descoberto no início dos anos 90, pode ser

utilizado como uma eficiente ferramenta para o controle de pragas (FIRE et al., 1998; WHYARD et al., 2009, ANDRADE; HUNTER, 2017).

O uso da tecnologia do RNAi para insetos sugadores, como os hemípteros, exige que as moléculas de dsRNA estejam presentes no sistema vascular das plantas, o que representa um dos principais desafios para o eficiente controle destes insetos (CHRISTIAENS; SMAGGHE, 2014). Apesar desta aparente dificuldade, Andrade e Hunter (2017), observaram taxas de até 56% de mortalidade para o psilídeo dos citros, *D. citri*, após submeter o inseto à alimentação em brotações tratadas com dsRNA homólogo ao gene da Argenina kinase, demonstrando a viabilidade do RNAi para o controle de insetos sugadores.

Com o avanço da tecnologia, será possível o desenvolvimento de produtos baseados em RNAi, porém, algumas perguntas ainda precisam ser respondidas. Uma dessas está relacionada à capacidade dos insetos de detectar a presença do dsRNA em uma planta e, assim, evitar se alimentar nela. Esta alteração na resposta do inseto está associada a mecanismos de resistência, como a resistência comportamental (DANG et al., 2017; ZALUCKI; FURLONG, 2017).

A resistência comportamental já foi associada ou observada em diferentes grupos de insetos. Foi constatado que a barata alemã, *Blattella germanica*, desenvolveu o comportamento de aversão à glicose para evitar iscas contendo este açúcar. Foi observado que este traço é uma característica herdável e desencadeada apenas pela glicose (WADA-KATSUMATA et al., 2013). Algo similar foi também observado em *Helicoverpa armigera*; diversos estudos demonstraram que larvas desta espécie possuem a capacidade de detectar e evitar plantas tratada com toxinas Bt (ZHANG et al., 2004; MEN et al., 2005; ZHAO et al., 2016). Além destes, pesquisas demonstram que mosquitos, vetores da malária, desenvolveram a capacidade de evadir de doses letais de inseticidas ao evitar ambientes internos, sugerindo uma resistência comportamental (GATTON et al., 2013; SOKHNA et al., 2013; KILLEEN; CHITNIS, 2014).

Este traço no comportamento pode ser caracterizado em dois tipos: (i) comportamento dependente de estímulo, onde o inseto deve ser estimulado sensorialmente para detectar uma superfície ou material tratado com uma toxina antes que adquira uma dose letal, ocasionando uma resposta de evitação ou repelência desencadeada pelo tóxico (GEORGHIOU, 1972; LOCKWOOD et al., 1984; CHAREONVIRIYAPHAP et al., 2013; DANG et al., 2017). (ii) comportamento

independente de estímulo, onde o inseto evita a toxina sem que haja estímulo sensorial associado a esta resposta (LOCKWOOD et al., 1984; DANG et al., 2017).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar se a presença do dsRNA em brotações de citros pode promover efeito de resistência comportamental em *D. citri* e alterar a dinâmica inseto-hospedeiro.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material biológico; mudas cítricas e colônia de insetos**

Para o desenvolvimento dos bioensaio, foi utilizado brotações obtidas de mudas de citrange 'Carrizo' [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck] mantidas em recipientes de aproximadamente 2 L, em casa de vegetação sob luz e temperatura ambiente. As plantas eram constantemente podadas a fim de promover o crescimento de novas brotações. A colônia do psíldeo foi mantida em Murta (*Murraya paniculata*), sob condições de laboratório a 27°C e fotoperíodo de 16h/8h (luz/escuro). Os experimentos de interação planta vs. inseto vetor foram realizados com indivíduos adultos com 5 dias após atingir a fase adulta, sem distinção de machos e fêmeas. Uma vez que o inseto atinge a fase adulta, este possui expectativa de vida de até 90 dias (LIU; TSAI 2000).

### **2.2 Seleção dos dsRNAs**

Para execução dos experimentos, foram selecionados dois dsRNAs específicos ao psíldeo; dsRNA-Ak e o dsRNA-Trehal, homólogos aos genes que codificam as proteínas Argenina kinase e Trehalase, respectivamente. Ambas as proteínas estão associadas ao processamento de carboidratos e metabolismo energético do psíldeo e que podem gerar taxa de mortalidade significativa a *D. citri* (ANDRADE; HUNTER, 2017). O dsRNA não específico a *D. citri* utilizado para execução dos experimentos é homólogo ao gene da proteína fluorescente verde (*Green fluorescent protein*, GFP – dsRNA-GFP).

### **2.3 Síntese das moléculas de dsRNA**

Para a síntese dos dsRNA-Ak e dsRNA-Trehal, foram utilizados pares de oligonucleotídeos (*primers*) para amplificação por PCR de um fragmento de DNA dos genes alvos (Tabela 1). Nas extremidades 5' de cada primer foi incluída a sequência do promotor reconhecido pela T7 RNA polimerase, enzima utilizada no

kit para a síntese do dsRNA. O fragmento correspondente à região dos genes alvo foi amplificado por RT-PCR, utilizando o RNA total extraído de *D. citri*, via reagente Trizol (Thermo-Fisher), seguindo o protocolo do fabricante e de acordo com Dos Santo Silva et al. (2022). Após a amplificação, os produtos de RT-PCR foram purificados e utilizados como molde para a síntese do dsRNA utilizando o MEGAscrip T7 Transcription Kit (Thermo-Fisher) seguindo o protocolo do fabricante. O dsRNA-GFP utilizado nos experimentos foi sintetizado em empresa especializada (AgroRNA).

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

Nome	Sequência <sup>1</sup>
dsRNA-AK-F3	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGTGGCATTCTTGTATGGCGTA</u>
dsRNA-AK-R2	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGGCCTGCAAGAATCTGTCTCC</u>
dsRNA-Trehal-F	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGTCAATGCGATCCTTCAGATG</u>
dsRNA-Trehal-R	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGGGTCTTCCGGACATGAAAGA</u>

<sup>1</sup>A sequência sublinhada corresponde a sequência do promotor T7.

## 2.4 Bioensaio

Para a montagem dos bioensaios de livre escolha, as brotações foram coletadas, sanitizadas com hipoclorito de sódio a 5% por 10 minutos e enxaguadas por três vezes em água destilada. Com uma lâmina (bisturi), o excesso de folhas foi removido, deixando apenas as três folhas mais jovens, que são as mais utilizadas para alimentação e postura de ovos a campo. A base do caule foi cortada em ângulo de 45° e as brotações foram padronizadas em aproximadamente 10 cm de comprimento. Em seguida, as brotações foram transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo 0,5 mL de solução de dsRNA a 1ng/μL (dsRNA diluído em água livre de RNase) ou água. A abertura dos microtubos foi selada com Parafilm® “M”. Após absorção de 90 – 95% da solução (dsRNA ou água), os tubos foram preenchidos com água (sempre que necessário, para manutenção do turgor e atividades biológicas da planta) e as brotações foram transferidas para suportes (racks), mantendo quatro brotações em cada rack (2 brotações de cada tratamento disposta ao acaso). Em gaiola entomológica (Bug-38 Dorm-2120®), quatro racks foram dispostos de maneira equidistante (totalizando 16 brotações, 8 de cada tratamento), e 50 adultos de *D. citri* foram liberados no centro da gaiola (Figura 1).

As gaiolas foram mantidas em câmara de crescimento, com fotoperíodo 12h/12h, temperatura a 27 °C e 80% de umidade relativa.

**Figura 1.** Esquema da instalação do bioensaio de livre escolha. (A) momento da liberação dos adultos de *D. citri*. (B) Gaiolas com bioensaio montado, cada uma representando 1 unidade experimental (dois blocos de um experimento ou bioensaio).



Autor: Jonatha dos Santos Silva

Foram realizados cinco experimentos, a saber (Tabela 2): (i) brotações tratadas com dsRNA ACP-específico vs brotações tratadas apenas com água (dsRNA-AK vs Água), (ii) brotações tratadas com dsRNA ACP não-específico vs brotações tratadas apenas com água (dsRNA-GFP vs Água), (iii) brotações tratadas com dsRNA ACP não-específico vs brotações tratadas com dsRNA ACP-específico (dsRNA-GFP vs dsRNA-Trehal), (iv) brotações tratadas com dois dsRNAs ACP-específico (dsRNA-AK vs dsRNA-Trehal), e (v) um experimento

controle, contendo apenas brotações tratadas com água. Cada unidade (bloco) experimental foi repetida ao menos quatro vezes.

**Tabela 2.** Esquema dos bioensaios de livre escolha montados.

Bioensaios	Tratamentos
I	dsRNA-AK x Água
II	dsRNA-GFP x Água
III	dsRNA-GFP x dsRNA-AK
IV	dsRNA-AK x dsRNA-Trehal
V	experimento controle (Água x Água)

Diariamente por um período de 10 dias, foi contabilizado o número de psilídeos em cada brotação e o número total de insetos nas brotações de cada tratamento. Insetos encontrados fora das brotações (nos racks, microtubos ou superfícies da gaiola) não foram contabilizados. Os dados foram organizados e submetidos à análise de variância (ANOVA) fatorial duplo em delineamento de blocos casualizados ( $p < 0,05$ ) usando o programa R, onde foi calculado o número médio de insetos vivos em cada tratamento durante os dias, bem como a comparação das médias.

### 3. RESULTADOS

Inicialmente, estabeleceu-se um bioensaio para avaliar a preferência de *D. citri* entre brotações tratadas com um dsRNA específico (dsRNA-AK) ou com apenas água. Ao longo do período avaliado, o número médio diário de insetos observados nas brotações tratadas com o dsRNA-AK foi similar ao observado em brotações tratadas apenas com água durante todo o período do bioensaio (Figura 2A). As médias diárias de insetos nas brotações com dsRNA-AK variaram entre 16,88 e 24,75 enquanto nas brotações com água o número médio de insetos variou entre 20,75 e 24,25. O número médio de insetos presentes nas brotações com dsRNA-AK não foi estatisticamente diferente dos presentes nas brotações apenas com água (Tabela 3). Resultado similar também foi observado em um segundo bioensaio em que se disponibilizou aos insetos brotações tratadas com dsRNA não específico (dsRNA-GFP) e brotações com água (Figura 2B). Nas brotações com o dsRNA-GFP, o número médio diário de insetos variou entre 17,50 e 20,38, enquanto nas brotações com água o número médio de insetos variou entre 15,75

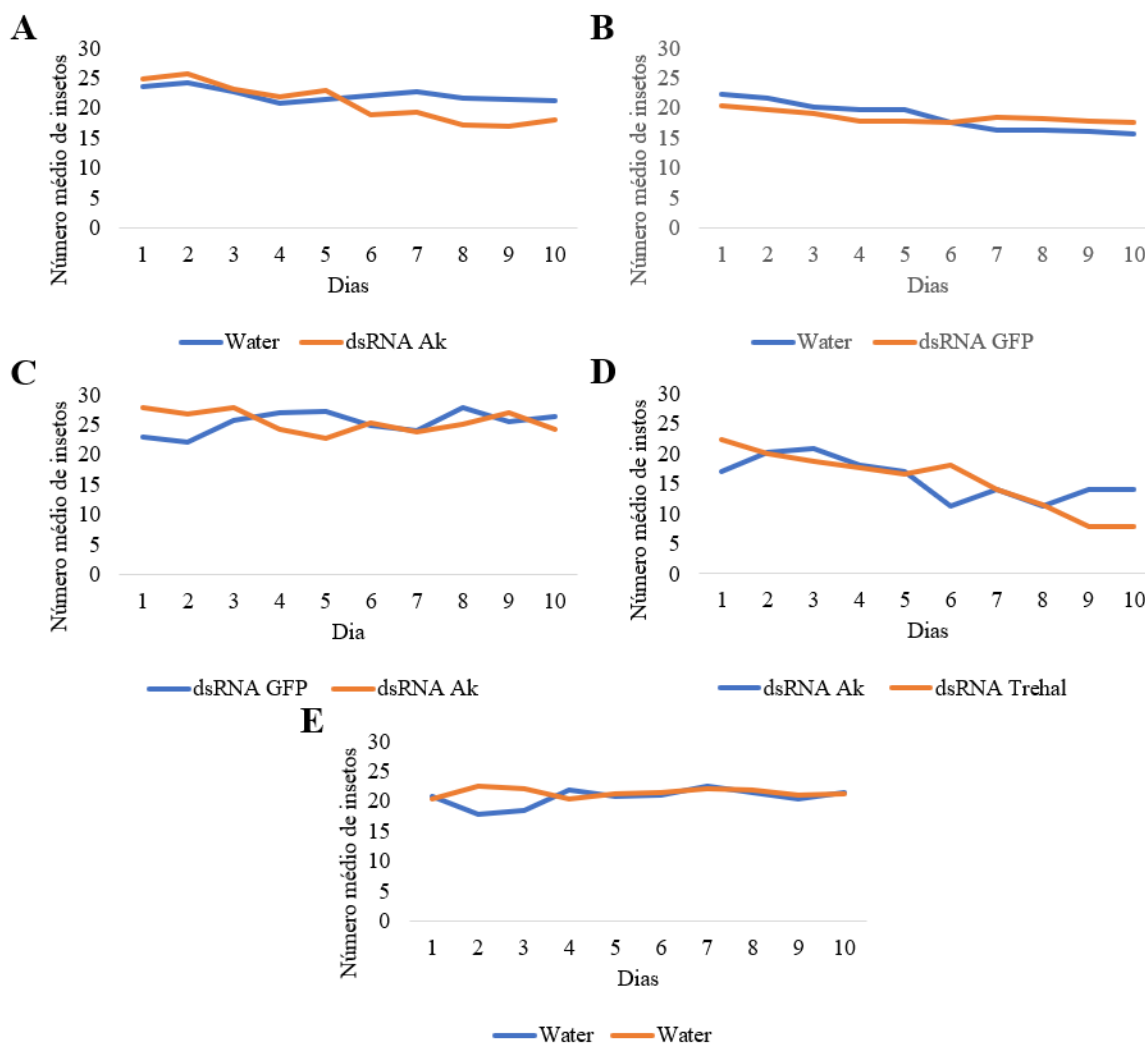
e 22,38 (Figura 2B). Análise estatística demonstrou não haver diferença no número médio de insetos presentes nas brotações tratadas com dsRNA-GFP e água (Tabela 3).

Posteriormente, foi avaliado a preferência dos insetos entre brotações tratadas apenas com dsRNA. No primeiro bioensaio foram utilizadas brotações tratadas com dsRNA específico e não específico (dsRNA-Ak x dsRNA-GFP, respectivamente). Ao longo do período avaliado, o número médio diário de insetos observados nas brotações tratadas com o dsRNA-AK foi similar ao observado em brotações tratadas com dsRNA-GFP. As médias diárias de insetos nas brotações com dsRNA-AK variaram de 22,75 a 27,75 para o dsRNA-AK, e de 22,00 a 27,75 para o dsRNA-GFP (Figura 2C). A análise estatística confirmou não haver diferença no número médio de insetos presentes nas brotações tratadas com o dsRNA-AK e dsRNA-GFP (Tabela 3). Em seguida foi estabelecido um bioensaio que continha apenas brotações tratadas com dsRNAs específicos (dsRNA-AK vs dsRNA-Trehal). Neste bioensaio, as médias diárias de insetos nas brotações com dsRNA-Ak variaram de 11,25 a 20,75 enquanto nas brotações nas brotações com dsRNA-Trehal a média diária variou de 7,75 a 22,25 (Figura 2D). Análise estatística no número médio de insetos presentes nas brotações neste bioensaio demonstrou não haver diferença no número médio de insetos presentes nas brotações tratadas com dsRNA-AK e dsRNA-Trehal (Tabela 3).

No bioensaio controle, onde foi utilizada brotações tratadas apenas com água, também não foi observado variação no processo de escolha, visto que as médias diárias se mantiveram estáveis ao longo dos dez dias, variando de 20,75 a 21,50 contra 20,25 a 21,25 (Figura 2E).



**Figura 2.** Comportamento de seleção de hospedeiro por *Diaphorina citri* em brotações tratadas com dsRNA ou água. Número médio diário de insetos por tratamento durante o período de dez dias. (A) dsRNA-Ak vs Água, (B) dsRNA-GFP vs Água, (C) dsRNA-GFP vs dsRNA-Ak, (D) dsRNA-Ak vs dsRNA-Trehal e (E) Água x Água.



Autor: Jonatha dos Santos Silva

É importante mencionar que apesar de serem liberados 50 insetos em cada gaiola, a soma das médias gerais na maioria dos bioensaios sempre estão abaixo de 50, incluindo no tratamento controle. Esta diferença pode ser explicada pela observação de insetos dispersos dentro da gaiola; nas paredes e/ou assoalho da gaiola, bem como, nos suportes e/ou microtubos, e que não foram contabilizados

**Tabela 3.** Análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste F a 5% de probabilidade.

Bioensaio		Ak vs Água		GFP vs água		GFP vs Ak		Ak vs Trehal		Água vs Água	
Nº médio de insetos		20,86a	22,18a	18,44a	18,53a	25,33a	25,45a	15,75a	15,43a	21,38a	20,63a
Pr>Fc	dsRNA	0,14615		0,86936		0,88726		0,74474		0,49563	
	Dia*dsRNA	0,59309		0,32011		0,25170		0,10058		0,96933	
	CV	26,39%		18,17%		15,46%		28,5%		23,29%	

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente. Pr>Fc = Valor de p associado a estatística calculada maior que 0,05, demonstrando que não houve diferença significativa entre os tratamentos de cada bioensaio (dsRNA), bem como não houve diferença entre os tratamentos ao longo dos dez dias (Dias\*dsRNA). CV = coeficiente de variação.

#### 4. DISCUSSÃO

A seleção de hospedeiro por *D. citri* pode influenciar diretamente no processo de transmissão do HLB. A escolha de um hospedeiro deriva de diversos fatores e envolvem a comunicação entre o inseto e a planta-alvo. Esta comunicação ocorre através de sinais químicos, olfatórios, gustatório, visuais, além do estágio de maturação do decido foliar. Patt et al. (2011) demonstraram em seu estudo que mesmo pequenas alterações em algum desses estímulos pode influenciar na resposta comportamental de *D. citri*.

No presente trabalho, foi observado que a presença das moléculas de dsRNA em brotações de citros não interfere no processo de seleção de hospedeiros pelo psilídeo, indicando que a presença do dsRNA não gera resposta de resistência comportamental para *D. citri*. Na abordagem utilizada nos experimentos de livre escolha, o dsRNA foi diluído em água e absorvido pelas brotações, portanto possibilitou avaliar se o inseto percebe a presença da molécula de dsRNA ao se alimentar na planta, ou se os efeitos causados no inseto pela ingestão de dsRNAs homólogos (dsRNA-AK e dsRNA-Trehal) poderiam alterar o seu comportamento alimentar. Os resultados demonstram que o psilídeo não tem a capacidade de detectar a presença do dsRNA nas brotações e que os efeitos causados pela ingestão destes dois dsRNAs homólogos também não alteraram o comportamento alimentar do psilídeo.

Os dois genes alvo destes dsRNAs, Argenina kinase e Trehalase, codificam proteínas associadas ao metabolismo energético em insetos, sendo Ak responsável por regular os níveis de ATP no corpo para ajudar na homeostase, enquanto a Trehalase catalisa a conversão da trealose em glicose (AZZI et al., 2004; SHUKLA et al., 2015). O efeito esperado da supressão destes genes pela

ingestão destes dsRNAs é uma menor disponibilidade energética nas células e tecidos do corpo do psílídeo, o que hipoteticamente poderia reduzir sua movimentação de uma planta a outra. Porém, esta carência energética também poderia estimulá-lo a procurar uma outra fonte de alimento para tentar suprir uma possível falta de energia. Os dados obtidos nos bioensaios que continham os dsRNAs homólogos (bioensaios I, III e IV) indicam que apesar de potencialmente estarem sendo afetados pelo dsRNAs homólogos, os insetos não evitaram se alimentar das brotações tratadas com estes dsRNAs, sugerindo que a hipótese de não movimentação devido a menor disponibilidade energética possar ser uma explicação. Entretanto, experimentos específicos precisam ser realizados para a comprovação desta hipótese.

É importante ressaltar que nos bioensaios realizados o dsRNA foi diluído em água e absorvido pelas brotações, assim não há o contato direto do inseto com o dsRNA. No entanto, é provável que um produto formulado com dsRNA para o controle do psílídeo seja desenvolvido para pulverização foliar, e uma vez na superfície da folha, a resposta do inseto possa ser diferente, seja pela percepção do dsRNA ou algum componente de sua formulação. Outro ponto importante a ser destacado é a redução constante no número de insetos presentes nas brotações do bioensaio IV (dsRNA-AK x dsRNA-Trehal), particularmente a partir do quarto dia (Figura 2D). O número médio de insetos nas brotações com dsRNA-AK passou de 20,75 insetos no 3º para 14 no 10º dia (32% de redução), enquanto o número médio de insetos nas brotações com dsRNA-Trehal passou de 22,25 no 1º dia para 7,75 no 10º dia (redução de 65%). Esta percepção é mais visível quando se compara com os bioensaios II e V (Água x dsRNA-GFP e Água x Água, respectivamente). A redução observada era esperada pois os dois dsRNAs específicos já foram demonstrados que induzem a mortalidade significativa ao psílídeo. Andrade e Hunter (2017) e Hunter et al. (2019) demonstraram que os dsRNA-AK e dsRNA-Trehal podem causar mortalidades de até 56% e 95%, respectivamente.

Similarmente ao reportado por Andrade e Hunter (2017), a redução no número de insetos se torna mais evidente a partir do quarto dia (Figura 2D), o que foi também observado em outros trabalhos. Upadhyay et al. (2011) ministraram dsRNA em *Bemisia tabaci* via ingestão de dsRNA diluído em dieta artificial; foram observadas taxas que variaram de 25 a 92% de mortalidade após 4 dias de tratamento, a depender do gene alvo. O mesmo foi observado por Galdeano et al.

(2017), que obtiveram taxas de mortalidade superiores a 22% após 4 dias de tratamento com dsRNA para ninfas e adultos de *D. citri*.

O maior potencial de mortalidade pelo dsRNA-Trehal se torna mais evidente ao comparar o com os ensaios I e III (dsRNA-Ak x água e dsRNA-GFP x dsRNA-AK, respectivamente), onde a redução do número médios de insetos nestes tratamentos é menos acentuada. No bioensaio I, o número médio de insetos nas brotações com água reduziu de 23,63 no 1º dia para 21,13 no 10º dia (redução de 10%), nas brotações com o dsRNA-Ak, a redução foi de 24,75 para 16,88 (redução de 32%). No ensaio III, a redução foi ainda menos expressiva, com redução de aproximadamente 18% para ambos os tratamentos. Seguindo está tendencia, no bioensaio II, (Água x dsRNA-GFP), no mesmo período, o número médio de insetos nas brotações com água passou de 22,38 para 15,75 (redução de 29%) e nas com dsRNA-GFP passou de 20,38 para 17,63 (redução de 13%). Uma situação que foi observada durante a execução do bioensaio II, e que pode explicar a uma redução mais acentuada no número médio de insetos nas brotações com água, foi a presença de algumas brotações que apresentavam aspecto murcho ou de baixo turgor para ambos os tratamentos, e que pode ter influenciado na redução do número médio de insetos presentes nas brotações de ambos os tratamentos, visto que neste bioensaio foi observado um maior número de insetos dispersos na gaiola.

Em geral, nas avaliações diárias de todos os bioensaios foram observados alguns insetos dispersos na gaiola, e por isso a soma dos insetos em todas as brotações presentes na gaiola não equivale ao número total de insetos liberados (50 insetos). Contudo, os dados sugerem que não há uma movimentação significativa dos insetos entre as brotações dos diferentes tratamentos (Figura 2). Em geral, não há uma tendência à concentração de insetos nas brotações de um tratamento em específico em qualquer um dos bioensaios realizados. Comportamento diferente foi observado em larvas de *Helicoverpa armigera*, que evitam se alimentar ou ovipositar em plantas de algodão transgênicas para toxina Bt. A diferença entre número de sítios de alimentação em plantas não-Bt foi de 3 a 9 vezes maior que em plantas Bt (ZHAO et al., 2016). Sendo assim, apesar de uma certa movimentação de insetos nos bioensaios, este movimento não foi estatisticamente significativo, e pode ser considerado ou comparado ao deslocamento normal do inseto em campo (KOBORI et al., 2011, SULZBACH et al., 2017).

Os dados deste trabalho foram obtidos de experimentos conduzidos em escala menor e condições controladas. Para a confirmação destes resultados, é importante que experimentos sejam conduzidos em casa de vegetação utilizando mudas ao invés de brotos, e com diferentes métodos de aplicação do dsRNA.

## 5. CONCLUSÕES

Os experimentos realizados no presente trabalho demonstraram que a presença das moléculas de dsRNA nas brotações de citros, independentes de serem específicas ou não ao psilídeo, não alteraram o a dinâmica psilídeo-hospedeiro, não havendo uma resposta de resistência comportamental. O psilídeo não é capaz de perceber a presença do dsRNA nas brotações. Neste sentido, pode-se inferir que não há evidências que indiquem atração ou repelência a *D. citri* à planta devido à presença das moléculas de dsRNA, o que pode ser considerado um bom resultado, já que o objetivo principal da técnica não é a redução da atratividade da cultura ao inseto, mas sim um efeito deletério sobre o organismo-alvo. Neste contexto, os dados corroboram com outros trabalhos que demonstram que a tecnologia tem alto potencial para o controle do psilídeo transmissor do HLB dos citros.

## 6. REFERÊNCIAS

ANDRADE, E.C.; HUNTER, W.B. RNAi Feeding bioassay: development of a non-transgenic approach to control asian citrus psyllid and other hemipterans. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 2, n. 3, p. 389-396, 2017. <https://doi.org/10.1111/eea.12544>

AZZI, A.; CLARK, S.A.; ELLINGTON, W.R.; CHAPMAN, M.S. The role of phosphagen specificity loops in arginine kinase. **Protein Science**, v. 13, n. 3, p. 575-585, 2004. <https://doi.org/10.1110/ps.03428304>

BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006. <https://dx.doi.org/10.4454/jpp.v88i1.828>

CHAREONVIRIYAPHAP, T. et al. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. **Parasites Vectors**, v. 6, n. 280, p. 280, 2013. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-280>

CHAVEZ, Y. et al. *Tamarixia radiata* (Waterston) and *Cheilomenes sexmaculata* (Fabricius) as biological control agents of *Diaphorina citri* Kuwayama in Ecuador. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 77, n. 2, p. 180-184, 2017. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392017000200180>

CHRISTIAENS, O.; SMAGGHE, G. The challenge of RNAi-mediated control of hemipterans. **Current Opinion in Insect Science**, v. 6, n. 1, p. 15-21, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.09.012>

DANG, K.; DOGGETT, S.L.; SINGHAM, G.V.; LEE, C-Y. Insecticide resistance and resistance mechanisms in bed bugs, *Cimex* spp. (Hemiptera: Cimicidae). **Parasites Vectors**, v. 10, n. 318, p. 1-31, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2232-3>

DOS SANTOS SILVA, J.; CERQUEIRA, L.R.S.; HUNTER, W.B.; ANDRADE, E.C. RNAi Feeding Bioassay: A Protocol for dsRNA Screening Against Asian Citrus Psyllid and Related Hemipteran Insects. **Methods in Molecular Biology**, v.2360, p.85-90, 2022. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1633-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1633-8_8)

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2020). Compare Data. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>. Access: 22 february 2021

FIRE, A.Z. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998. <https://doi.org/10.1038/35888>

GALDEANO, D.M. et al. Oral delivery of double-stranded RNAs induces mortality in nymphs and adults of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Plos One**, v. 12, n. 3, p. 1-15, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171847>

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J.M. Etiology of citrus Greening disease. **Annals of Microbiology**, v. 153, n. 1, p.169-179, 1984. [https://doi.org/10.1016/s0769-2609\(84\)80075-7](https://doi.org/10.1016/s0769-2609(84)80075-7)

GATTON, M.L. et al. The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa. **Evolution**, v. 67, n. 4, p. 1218-1230, 2013. <https://dx.doi.org/10.1111%2Fevo.12063>

GEORGHIOU, G.P. The evolution of resistance to pesticides. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 3, n. 1, p. 133–68, 1972. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.03.110172.001025>

HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (sternorrhyncha: Psyllidae) and Greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in florida. **Florida Entomological Society**, v. 87, n. 3, p. 330-353, 2004. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2004\)087\[0330:ACPSPA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2004)087[0330:ACPSPA]2.0.CO;2)

HUNTER, W.B; GONZALEZ, M.T.; ANDRADE, E.C. Double stranded RNA compositions for reducing Asian citrus psyllid infestations and methods of use (U.S. Patent No. 10,344,291). **U.S. Patent and Trademark Office**, 2019. <https://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnetacgi%2FPTO%2Fsearch-bool.html&r=1&f=G&l=50&co1=AND&d=PTXT&s1=10,344,291.PN.&OS=PN/10,344,291&RS=PN/10,344,291>

KEREMANE, M.L. et al. Report of *Candidatus Liberibacter caribbeanus*, a new citrus- and psyllid-associated *Liberibacter* from Colombia, South America. **American Phytopathological Society**, 2015. [https://www.apsnet.org/meetings/Documents/2015\\_meeting\\_abstracts/aps2015abO253.htm](https://www.apsnet.org/meetings/Documents/2015_meeting_abstracts/aps2015abO253.htm) Access: 12 January 2022

KILLEEN, G.F.; CHITNIS, N. Potential causes and consequences of behavioural resilience and resistance in malaria vector populations: a mathematical modelling analysis. **Malaria Journal**, v. 13, n. 97, p. 1-16, 2014. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-97>

KOBORI, Y.; NAKATA, T.; OHTO, Y.; TAKASU, F. Dispersal of adult Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the vector of citrus greening disease, in artificial release experiments. **Applied Entomology and Zoology**, v. 46, n. 1, p. 27–30, 2011. <https://doi.org/10.1007/s13355-010-0004-z>

LIU, X. et al. Knockdown of the Trehalose-6-Phosphate Synthase Gene Using RNA Interference Inhibits Synthesis of Trehalose and Increases Lethality Rate in Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Insects**, v. 11, n. 9, p. 605, 2020. <https://doi.org/10.3390/insects11090605>

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, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2000.tb00060.x>

LOCKWOOD, J.A.; SPARKS, T.C.; SORY, R.N. Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. **Annals of the entomological society of america**, v. 30, n. 4 p. 41–51, 1984. <https://doi.org/10.1093/besa/30.4.41>

MEN, X.; GE, F.; YARDIM, E.N.; PARAJULEE, M.N. Behavioral Response of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cotton with and Without Expression of the CryIAc  $\delta$ -Endotoxin Protein of *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Journal of Insect Behavior**, v. 18, n. 3, p. 33-50, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10905-005-9345-9>

NAEEN, A. et al. First report of thiamethoxam resistance selection, cross resistance to various insecticides and realized heritability in Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* from Pakistan. **Journal of Crop Protection**, v. 121, n. 1, p. 11-17, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.03.004>

PATT, J.M. et al. Multimodal cues drive host-plant assessment in asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*). **Environmental Entomology**, v.40, p.1494-1502, 2011. <https://doi.org/10.1603/en11149>

QURESHI, J.A.; KOSTYK, B.C.; STANSLY, P.A. Insecticidal Suppression of Asian Citrus Psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) Vector of Huanglongbing Pathogens. **Plos One**, v. 9, n. 6, p. 1-22, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112331>

RODRIGUES, T.B. et al. First Sprayable Double-Stranded RNA-Based Biopesticide Product Targets Proteasome Subunit Beta Type-5 in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. 728652, p. 1-15, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.728652>

SHUKLA, E.; THORAT, L.; NATH, B.; GAIKWAD, S. Insect trehalase: physiological significance and potential applications. **Glycobiology**, v. 25, n. 4, p. 357–367, 2014. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu125>

SOKHNA, C.; NDIATH, M.O.; ROGIER, C. The changes in mosquito vector behaviour and the emerging resistance to insecticides will challenge the decline of malaria. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 10, p. 902-907, 2013. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12314>

SULZBACH, M. et al. Risk analysis of introduction and spread of huanglongbing in citrus groves in Rio Grande do Sul, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 1, p. 49–58, 2018. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0198-5>

TEIXAIRA, D.C. et al. '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (Greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1857-1862, 2005. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63677-0>

TOFANGSAZI, N. et al. Residual toxicity of selected organic insecticides to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and non-target effects on *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in California. **Journal of Crop Protection**, v. 108, n. 1, p. 62-70, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.02.006>

UPADHYAY, S.K. et al. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 1, p. 153–161, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9009-1>

USDA - United States Department of Agriculture (2021). Citrus: World Markets and trade. Global Agricultural Outlook Board. IOP Publishing PhysicsWeb. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>. Access: 31 July 2021

WADA-KATSUMATA, A.; SILVERMAN, J.; SCHAL, C. Changes in taste neurons support the emergence of an adaptive behaviour in cockroaches. **Science**, v. 340, n. 6135, p. 972–975, 2013. <https://doi.org/10.1126/science.1234854>



WHYARD, S.; SINGH, A.D.; WONG, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 11, p. 824-832, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.09.007>

ZALUCKI, M.P.; FURLONG, M.J. Behavior as a mechanism of insecticide resistance: evaluation of the evidence. **Current Opinion in Insect Science**, v. 21, n. 1, p.19-25, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.05.006>

ZHANG, J.H.; WANG, C.Z.; QIN, J.D.; GUO, S.D. Feeding behaviour of *Helicoverpa armigera* larvae on insect-resistant transgenic cotton and non-transgenic cotton. **Journal of Applied Entomology**, v. 128, n. 3, p. 218-225, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2004.00841.x>

ZHAO, D. et al. Oviposition and feeding avoidance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) against transgenic Bt cotton. **Journal of Applied Entomology**, v. 140, n. 9, p. 715–724, 2016. <https://doi.org/10.1111/jen.12304>

## CAPÍTULO 2

### **Metodologia para extração e detecção de dsRNA em solo e avaliação da sua dinâmica de degradação**

**RESUMO:** A tecnologia do RNA interferente (RNAi) tem sido uma das abordagens mais promissoras para a proteção de plantas contra pragas. O mecanismo é ativado por moléculas de RNA fita dupla (dsRNA). A aplicação de produtos formulados com dsRNA para o controle de pragas poderá ser realizado tanto via pulverização ou diretamente no solo e ser absorvido pelas raízes. Estas duas formas de aplicação irão resultar em potencial acúmulo de dsRNA no solo, o que levanta questionamentos quanto a possíveis efeitos adversos em organismos residentes no solo. Apesar de evidências sugerirem que o dsRNA aplicado no solo é rapidamente degradado, é necessário que metodologias de extração e detecção de dsRNA no solo estejam disponíveis para que estudos de segurança ambiental possam ser conduzidos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um método para extração e detecção de dsRNA no solo e avaliar o tempo de permanência destas moléculas em solo. Para isso, foi coletada amostra de solo, onde foi aplicada uma solução de dsRNA homólogo ao gene da proteína fluorescente verde (*Green fluorescent protein*, GFP – dsRNA-GFP). Para extração do dsRNA, a amostra de solo foi ressuspensa em 10 mL de tampão PBS-T e o sobrenadante foi coletado e filtrado. Cerca de 100 µL do filtrado foi utilizado para extração de RNA total. O dsRNA foi detectado nas amostras tanto por RT-PCR quanto PCR em tempo real (RT-qPCR). Utilizando a metodologia desenvolvida, foi possível extrair e detectar a presença das moléculas de dsRNA até 136 horas após aplicação no solo, indicando que o método é eficiente e que o dsRNA pode se manter estável no solo por períodos mais longos que os relatados na literatura científica.

**Palavras chave:** RNA interferente, Silenciamento gênico, Controle de pragas

## Methodology for extraction and detection of dsRNA in soil

**ABSTRACT:** RNA interference (RNAi) technology has been one of the most promising approaches for plant protection against pests. The mechanism is activated by double-stranded RNA (dsRNA) molecules. The application of products formulated with dsRNA for pest control can be carried out either via spraying or directly into the soil and be absorbed by the roots. These two forms of application will result in potential accumulation of dsRNA in the soil, which raises questions about possible adverse effects on soil-resident organisms. Although evidence suggests that dsRNA applied to soil is rapidly degraded, it is necessary that methodologies for extraction and detection of dsRNA in soil are available so that environmental safety studies can be conducted. Thus, the present work aimed to establish a method for extraction and detection of dsRNA in soil and to evaluate the residence time of these molecules in soil. For this, a soil sample was collected, where a solution of dsRNA homologous to the green fluorescent protein gene (Green fluorescent protein, GFP - dsRNA-GFP) was applied. For dsRNA extraction, the soil sample was resuspended in 10 mL PBS-T buffer and the supernatant was collected and filtered. About 100  $\mu$ L of the filtrate was used for total RNA extraction. dsRNA was detected in the samples by both RT-PCR and real-time PCR (RT-qPCR). Using the developed methodology, it was possible to extract and detect the presence of dsRNA molecules 136 hours after application in soil, indicating that the method is efficient and that dsRNA can remain stable in soil for longer periods than those reported in the scientific literature.

**Key words:** RNA interference, Gene silencing, Pest control

## 1. INTRODUÇÃO

RNA interferente (RNAi) é um mecanismo natural que ocorre em células eucarióticas e está envolvido na regulação gênica e defesa antiviral. O mecanismo é ativado por moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA) e resulta na degradação de RNAs mensageiros (mRNAs) homólogos ao dsRNA (FIRE et al., 1998). A especificidade do mecanismo permite o silenciamento de genes essenciais a um único organismo-alvo, reduzindo possíveis efeitos adversos sobre organismos não-alvo, o que torna a tecnologia, conceitualmente, o defensivo “ideal” (FIRE, 2007; ANDRADE; HUNTER, 2016).

O RNAi apresenta uma ampla adaptabilidade de uso, e pode ser empregado por abordagens transformativas, através do desenvolvimento de plantas transgênicas, e não transformativa, através de produtos à base de dsRNA e que tem se tornado a principal foco da pesquisa para fins comerciais, visto que possibilita o uso da tecnologia em qualquer cultura (CAGLIARI et al., 2019). Entretanto, ao se utilizar o RNAi para o controle de pragas, é importante avaliar caso a caso, pois ambas as abordagens apresentam suas limitações.

O uso não transformativo da tecnologia dos RNAi para o controle de determinados grupos de insetos se mostra mais desafiador que para outros (TERENIUS et al., 2011; BOLOGNESI et al., 2012; KATOCH; THAKUR, 2012; BACHMAN et al., 2013; SHUKLA et al., 2016). Para hemípteros, que são insetos sugadores, é necessário que as moléculas de dsRNA estejam presentes no sistema vascular das plantas. Neste sentido, o método de disponibilização do dsRNA é um dos principais desafios para o controle desses organismos (CHRISTIAENS; SMAGGHE, 2014). Neste caso, a aplicação do dsRNA em solo pode ser uma importante alternativa que pode ser incorporada às culturas irrigadas, uma vez que o dsRNA pode ser absorvido pelas raízes (HUNTER et al., 2012; LI et al., 2015). Entretanto, um dos principais entraves ou questionamento, são as possíveis interações das moléculas de dsRNA com o meio ambiente após sua aplicação.

Existe uma demanda para avaliação de possíveis riscos ambientais relacionados ao uso de produtos baseados no RNAi. Neste sentido, busca-se determinar o destino, possíveis rotas e duração de exposição de um defensivo à base de dsRNA ao ser liberado no ambiente (FISCHER et al., 2016; PARKER; SANDER, 2017; ZHANG et al., 2020). Há uma atenção especial para o possível acúmulo de moléculas de dsRNA em solo, visto que este é o principal receptor de

possíveis contaminantes aplicados na agricultura, além de proteínas e ácidos nucleicos liberados por entidades biológicas (PIETRAMELLARA et al., 2009; FISCHER et al., 2016). Estes questionamentos estão associados a potenciais efeitos significativos ao ecossistema ou ameaças a espécies não-alvo através de interações entre as moléculas de dsRNAs e organismos nativos (AUER; FREDERICK, 2009).

Não obstante, pesquisas apontam para uma alta suscetibilidade das moléculas de dsRNA, assim como o DNA e RNA fita simples (ssRNA), às condições adversas do meio ambiente (PIETRAMELLARA et al., 2009; FISCHER et al., 2016). Os dados disponíveis até o momento, demonstram que não é possível detectar o dsRNA em período superior a 72 horas após aplicação em solo (ZHANG et al., 2020). Além disso, sua concentração cai drasticamente dentro das primeiras 16 horas, mesmo em solos com baixa atividade microbiana (DUBELMAN et al., 2014; PARKER et al., 2019; ZHANG et al., 2020).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um método para extração e detecção de dsRNA no solo e avaliar o tempo máximo de permanência de moléculas de dsRNA aplicadas em solo cultivado com citros.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Seleção do dsRNA e do local para coleta do solo**

O dsRNA utilizado para execução deste experimento é homólogo ao gene da proteína fluorescente verde (*Green fluorescent protein*, GFP – dsRNA-GFP) (Acesso nº AJ306911.1 do Genbank), que é utilizado como um gene referência ou controle.

A amostra de solo foi coletada na área onde está estabelecido o Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF) em Cruz das Almas - BA, 12°40'39" Sul, 39°06'23" Oeste de Greenwich. Segundo Passos et al. (2007), o solo é do tipo Latossolo amarelo distrófico A moderado, com textura franco argilo-arenosa.

### **2.2 Coleta de solo e aplicação do dsRNA**

A amostra de solo foi coletada com o auxílio de tubo galvanizado de 5/8". O tubo foi inserido no solo até a profundidade de 20 cm (Figura 1 A e B). Após coleta, a amostra foi dividida em duas subamostras: de 0-10 e 10-20 cm de profundidade.

Cada uma destas amostras foi homogeneizada, obtendo-se uma subamostra de 50 g de solo que foi utilizada para a montagem do experimento. Em cada uma das subamostras, foram adicionados 3 mL de solução aquosa contendo um total de 7,5 µg de dsRNA-GFP. Após adição, cada uma das subamostras foi homogeneizada e cerca de 1g de solo com dsRNA foi transferido para tubos de 15 mL (Figura 1 C). Todos os tubos foram vedados com papel alumínio, com a finalidade de simular a baixa luminosidade da rizosfera, e mantidos à temperatura ambiente por períodos de incubação pré-estabelecidos (1, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120 e 136 horas). Como controle negativo, foi utilizada uma amostra de solo não tratada com a solução de dsRNA. Todo o experimento foi montado em duplicata.

**Figura 1.** Montagem do experimento para extração de dsRNA em solo. Coleta da amostra de solo em área de plantação de citros (A e B). Transferência de amostra de solo para tubos de 15 mL após aplicação do dsRNA-GFP (C). Filtragem da amostra após suspensão em tampão PBST (D).



Autor: Jonatha dos Santos Silva

### 2.3 Extração das amostras

Para a extração do dsRNA, foram adicionados 10 mL de tampão PBS-T (1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 137 mM  $\text{NaCl}$ , 2,7 mM  $\text{KCl}$ , 0,001% Tween 20, pH

7,0) no tubo contendo o solo. Após suspensão e homogeneização em vortex, 1,5 mL do sobrenadante foi coletado com o auxílio de uma seringa (5 mL) e submetido à filtração utilizando o filtro Chromafil® Xtra PET 25 mm 0,45 µm (Macherey-Nagel) (Figura 1 D). Em seguida, 100 µL do filtrado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e o RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (ThermoFisher), seguindo protocolo do fabricante. O RNA total extraído foi ressuspensionado em 30 µL de água livre de RNAses.

#### **2.4 Reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)**

O RNA total foi submetido à síntese do cDNA utilizando o kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription” (ThermoFisher). Para reação, em um microtubo de 200 µL, foram adicionados 10 µL do RNA total, o microtubo foi incubado a 70 °C por 2 min e, em seguida transferido para um recipiente com gelo. Ao RNA total foram adicionados 2,0 µL do tampão 10x RT, 0,8 µL dNTP (100 mM), 2,0 µL de iniciadores randômicos, 1,0 µL da enzima Transcriptase Reversa MultiScribe™ (50 U/µL) e 4,2 µL de água livre de nucleases. Após homogeneização, as amostras foram incubadas a 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min, 85 °C por 5 min, e as reações mantidas em 4 °C até retirada do aparelho. O controle positivo foi obtido a partir da reação de transcrição reversa de 1,0 µL da solução de dsRNA (500 ng/µL) utilizada no tratamento das amostras de solo.

Para reação de PCR convencional, foi utilizado o kit comercial GoTaq® MDx DNA Polymerase (Promega) e oligonucleotídeos (primer) específicos para o dsRNA-GFP (Tabela 1). Para a reação foram utilizados 2 µL do cDNA, 10 mM de cada primer (GFP R3/GFP F3; Tabela 1), 4 µL de tampão 5X Green GoTaq®, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de dNTP's a 10 mM, 0.3 µL de GoTaq® MDx DNA Polymerase (5 U/ µL) e 5,7 µL de água livre de nucleases, totalizando 20 µL. A reação de amplificação foi realizada com as seguintes condições de amplificação: 94 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos à 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 50 s, uma etapa à 72 °C por 5 minutos, e mantidas em 4 °C até a retirada do aparelho. Ao final da reação foram adicionados 4 µL de GelRed® (10x) e as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Para reação de PCR em tempo real (qPCR), foi utilizado o kit SYBR™ Select Master Mix (ThermoFisher). Em cada reação foram adicionados 1 µL de cDNA, 10

mM de cada rimer (GFP R4/F4; Tabela 1), 7,5  $\mu$ L 2x master Mix e 4,5  $\mu$ L de água livre de nucleases, totalizando 15  $\mu$ L. As amostras foram incubadas no 7500 Fast Real-Time PCR System, e submetidas a 40 ciclos a 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min e finalizadas pela análise da curva de dissociação entre 72 e 95°C.

**Tabela 1.** Iniciadores usados para detecção do dsRNA-GFP.

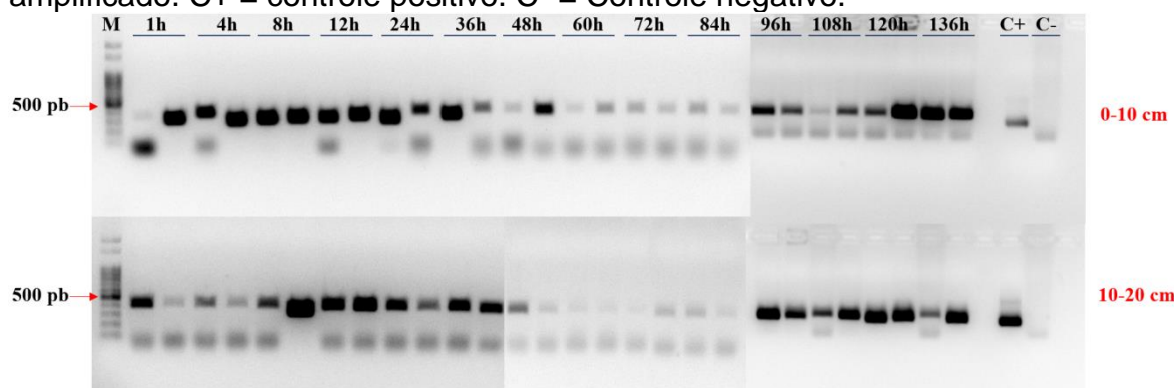
Nome	Sequência (5' para 3')	Tamanho
<b>GFP R3</b>	TAC AAG ACA CGT GCT GAG GT	20
<b>GFP F3</b>	TGG TAA AAG GAC AGG GCC AT	20
<b>GFP R4</b>	GTG CAG GAG AGG ACC ATC TT	20
<b>GFP F4</b>	CTT GTG GCC GAG GAT GTT TC	20

### 3. Resultados

Em testes preliminares, foi feita a extração do RNA total a partir do sobrenadante obtido após suspensão no tampão PBS-T. Entretanto, o RNA total extraído não possibilitou a amplificação do fragmento do dsRNA por RT-PCR. O processo de extração foi repetido, entretanto foi incluído uma etapa de filtragem do sobrenadante em microfiltro de 0,45  $\mu$ m. A extração a partir do sobrenadante filtrado possibilitou obter RNA de qualidade que possibilitaram a detecção do dsRNA-GFP nos testes de RT-PCR e RT-qPCR (Figura 2 e 3).

O RNA total extraído foi testado para a presença do dsRNA-GFP sendo possível detectar o dsRNA em todas as amostras de solo avaliadas. O resultado se mostrou similar para ambas as profundidades avaliadas – 0-10 cm e de 10-20 cm – bem como para todos os períodos de incubação, de 1h a 136h (Figura 2).

**Figura 2.** Eletroforese dos produtos de RT-PCR para detecção do dsRNA-GFP em solo após diferentes períodos de incubação. Seta vermelha indica o fragmento amplificado. C+ = controle positivo. C- = Controle negativo.



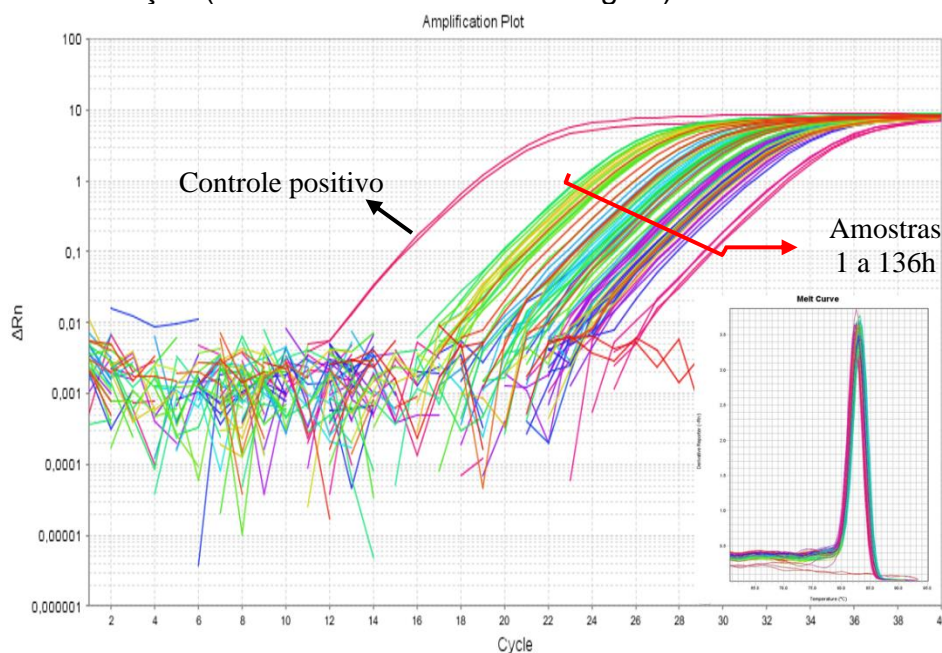
Autor: Jonatha dos Santos Silva



As bandas amplificadas possuem o tamanho esperado (~383 pb), mas há uma notada diferença na intensidade das bandas, e que se deve à não padronização da concentração das amostras de RNA total extraído ao submetê-las ao teste de RT-PCR. Estes dados demonstraram que o dsRNA pode se manter estável em solo, nas condições experimentais utilizadas, por pelo menos 136 horas após aplicação em solo.

Para confirmar que realmente não houve amplificação inespecífica, as amostras de ambas as profundidades foram submetidas ao teste de PCR em tempo real, que por ser uma técnica bem mais sensível que a PCR convencional, seria capaz de detectar quantidades reduzidas de dsRNA. O resultado do teste de qPCR detectou a presença do dsRNA em todas as amostras e em todos os períodos de incubação para ambas as profundidades (Figura 3), confirmando o resultado do RT-PCR. A especificidade da amplificação pode ser confirmada ao observar a uniformidade da curva de dissociação realizada após a reação da qPCR (Figura 3, canto inferior). A curva de dissociação é gerada pelo equipamento (termociclador) ao submeter o fragmento amplificado gerado durante reação de qPCR a um aumento gradativo de temperatura, que resulta na diminuição da fluorescência das amostras em virtude da dissociação da fita dupla do DNA e consequente liberação do corante SyberGreen.

**Figura 3.** Curva de amplificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para as amostras de 1 a 136 horas para as profundidades de 0-10 e de 10-20 cm. Todas as amostras testaram positivas para a presença do dsRNA-GFP. A especificidade da amplificação pode ser observada pelo pico único e uniforme na curva de dissociação (canto inferior direito da imagem).



Autor: Jonatha dos Santos Silva

#### 4. DISCUSSÃO

O avanço em direção à geração e disponibilização de produtos à base de dsRNA para uso agrícola levanta questões sobre o acúmulo destas moléculas no ambiente e o seu potencial dano ambiental. O solo é o principal acumulador de produtos aplicados em ambientes agrícolas seja pela lavagem dos produtos aplicados na parte aérea das plantas ou aplicados diretamente no solo. Inicialmente, evidências apontavam para uma permanência máxima de até 36 horas para o dsRNA após aplicado em solo (DUBELMAN et al., 2014). Mais recentemente, Zhang et al. (2020) demonstraram que é possível detectar moléculas de dsRNA 72 h após aplicação em solo. Contrariando esses resultados anteriores, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que esse tempo pode ser ainda maior, visto que nas condições experimentais utilizadas, o dsRNA aplicado no solo foi detectado 136 h após aplicação em solo. É interessante observar que o método de detecção apresentado por Zhang et al. (2020) é o mesmo empregado neste trabalho (RT-qPCR), enquanto no trabalho publicado por Dubelman et al. (2014), foi utilizado o método QuantiGene 2.0 (QGP). Wang et al. (2018) compararam ambos os métodos em plantas geneticamente modificadas (OGM) via RNAi, e

concluíram que ambos os métodos podem ser utilizados para quantificação de moléculas de dsRNA em OGM, assim a diferença do tempo de permanência do dsRNA no solo encontrado nestes dois trabalhos pode estar relacionado ao desenho experimental adotado em cada um dos trabalhos.

Para os trabalhos supracitados, após a coleta, as amostras de solo foram submetidas a processamentos; separação de detritos, secagem e armazenamento em temperatura ambiente ou refrigerada até o momento de uso. No presente trabalho, após a coleta, o solo foi imediatamente utilizado e não passou por processamentos além da pesagem e aplicação do dsRNA. A solução de dsRNA utilizados nestes experimentos, bem como o método de incubação diferem. Dubelman et al. (2014) utilizaram uma solução dsRNA contendo massa vegetal e tampão PBST. Zhang et al. (2020) aplicaram o dsRNA juntamente com tampão de ácido propano sulfônico e NaCl, além de manter as amostras em rotor com temperatura controlada. Ao passo que o presente trabalho utilizou água Milli-Q® para diluição da concentração e obtenção do volume da solução de dsRNA utilizados no experimento. Apesar de todos os trabalhos utilizarem o tampão PBST para ressuspensão do dsRNA aplicado ao solo, é possível constatar que houve variação no pH em cada um deles. Dubelman et al. (2014) avaliaram a degradação do dsRNA em três tipos de solo (franco arenoso, silto-arenoso e argilo-arenoso), recomendado pH mais alcalinos para solos mais argilosos. Zhang et al. (2020) testaram dois tipos de solo (franco argilo-arenoso e franco arenoso-fino) e observaram que o tampão em pH maiores que 10 apresentaram melhores resultados de extração. Contrariando estas observações, o presente trabalho testou um solo franco argilo-arenoso, e o tampão com pH 7, onde foi possível extrair e detectar o dsRNA em maiores períodos de incubação. Neste contexto, podemos sugerir que as particularidades metodológicas em cada trabalho podem ter influenciado nos resultados obtidos em cada um deles.

Além disto, o solo é um ambiente muito variável na sua composição, característica que pode influenciar o processo de captura (adsorção) de moléculas assim como sua dinâmica de degradação. As argilas presentes no solo tendem a adsorver ácidos nucleicos através de interações catiônicas ou troca de ligantes. O solo utilizado neste experimento é do tipo argilo-arenoso, o que sugere uma alta adsorção do dsRNA a essa partícula presente no solo. Esta observação foi feita por Zhang et al. (2020) ao comparar a massa de dsRNA em extratos de solos franco

argilo-arenoso e franco arenoso-fino; foi observada uma diferença superior a 50% nas massas de dsRNA presente no solo franco argilo-siltoso comparado ao franco arenoso-fino.

Apesar do solo poder variar em composição em função da profundidade, em geral a matéria orgânica (MO) se concentra nas camadas mais superficiais do solo (até 30 cm) (BERNOUX et al., 2002), talvez por isso, não foram observadas diferenças para a detecção do dsRNA nas diferentes profundidades avaliadas, de 0-10 e de 10-20 cm. Porém, a alta concentração de impureza, devido a matéria orgânica e conseqüentemente maior atividade biológica podem afetar a reação RT-qPCR. Por esta razão, a filtragem em Chromafil® foi uma etapa essencial para o processo de extração e detecção do dsRNA, uma vez que atua de forma direta na retenção destas impurezas, influenciando diretamente na qualidade do RNA total extraído. Além disso, maiores concentrações de matéria orgânica oferecem locais de superfície para adsorção do dsRNA, bem como para DNA, RNA e enzimas, evitando a degradação dsRNA (CAI et al., 2006; PARKER et al., 2019). Neste trabalho, não foi verificado o nível de atividade microbiológica no solo utilizado neste experimento, porém Parker et al. (2019) observaram que o processo de degradação ou dissipação do dsRNA independe da atividade biológica do solo. Neste sentido, é esperado que mesmo que o solo utilizado apresente uma baixa atividade microbiana, em algum momento, o dsRNA-GFP será completamente degradado e, conseqüentemente, não mais detectado. Conquanto, é necessária a avaliação por períodos mais longos de observação. Outro ponto importante a salientar é que estes dados foram obtidos de experimentos *in vitro*, onde as condições são mais estáveis que em campo. É possível que no meio ambiente, as moléculas dsRNA não se apresentem tão estáveis.

## 5. CONCLUSÕES

O método de extração e detecção se mostrou eficiente e pode ser aplicado tanto para técnicas convencionais como o RT-PCR quanto para técnicas mais avançadas e sensíveis como a de qPCR. Ficou constatado que a profundidade do solo não interferiu no processo de degradação da molécula. Não obstante, a detecção da presença do dsRNA 136 h após aplicação foi superior aos valores relatados na literatura científica, o que requer estudos com períodos de observação mais prolongados, além de testes em campo, onde as condições ambientais podem

influenciar na estabilidade da molécula para se determinar com maior precisão o tempo estimado para a degradação do dsRNA aplicado ao solo.

## 6. REFERÊNCIAS

ANDRADE, E.C.; HUNTER, W.B. RNA Interference – natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC). **InTech**, v. 1, n. 3, p. 391-409, 2016.

AUER, C.; FREDERICK, R. Crop improvement using small RNAs: applications and predictive ecological risk assessments. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 11, p.644–651, 2009.

BACHMAN, P.M. et al. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity Against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). **Transgenic Research**, v. 22, n. 6, p. 1207-1222, 2013.

BERNOUX, M.; CARVALHO, M.C.S.; VOLKOFF, B.; CERRI, C.C. Brazil's Soil Carbon Stocks. **Soil Science Society of America Journal**, v. 66, n. 3, p. 888-896, 2002.

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. e47534, 2012.

CAI, P.; HUANG, Q.; ZHANG, X.; CHEN, H. Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 471–476, 2006.

CAGLIARI, D. et al. Management of pest insects and plant diseases by non-transformative RNAi. **Front. Plant Science**, v. 10, n. 1319, p. 1-18, 2019.

CHEN, J.; XIE, J. Progress on RNAi-based molecular medicines. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, n. 1, p. 3971-3980, 2012.

CHRISTIAENS, O.; SMAGGHE, G. The challenge of RNAi-mediated control of hemipterans. **Current Opinion in Insect Science**, v. 6, n. 1, p. 15-21, 2014.

DUBELMAN, S. et al. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e93155, 2014.

FIRE, A.Z. Gene silencing by double-stranded RNA. **Angewandte Chemie**, v. 46, n. 36, p. 6966-6984, 2007.

FIRE, A.Z.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, A.S.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FISCHER, J.R.; ZAPATA, F.; DUBELMAN, S.; MUELLER, G.M.; JENSEN, P.D.; LEVINE, S.L. Characterizing a novel and sensitive method to measure dsRNA in soil. **Chemosphere**, v. 161, n. 1, p. 319-324, 2016.

HUNTER, W.B.; GLICK, E.; PALDI, N.; BEXTINE, B.R. Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression. **Southwestern Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 85–87, 2012.

KATOCH, R.; THAKUR, N. Insect gut nucleases: a challenge for RNA interference mediated insect control strategies. **International Journals of Biotechnology and Biochemistry**, v. 1, n. 8, p. 198-203, 2012.

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 & Environment**, v. 38, n. 11, p. 2277–2285, 2015.

MITTER, N.; WORRALL, E.A.; ROBINSON, K.E.; XU, Z.P.; CARROLL, B.J. Induction of virus resistance by exogenous application of double-stranded RNA. **Current Opinion in Virology**, v. 26, n.1, p. 49–55, 2017.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 279-289, 1990.

PARKER, K.M. et al. Environmental fate of RNA interference pesticides: Adsorption and degradation of double-stranded RNA molecules in agricultural soils. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 6, p. 3027–3036, 2019.

PASSOS, O.S. et al. Banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical: Passado, presente e future. **Embrapa**, v.1, n. 3, p.1-61, 2007.

PARKER, K.M.; SANDER, M. Environmental fate of insecticidal plant-incorporated protectants from genetically modified crops: knowledge gaps and research opportunities. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 21, p. 12049-12057, 2017.

PIETRAMELLARA, G. et al. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, n. 1, p.219–235, 2009.

SHUKLA, J.N. et al. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. **RNA Biology**, v. 13, n. 7, p. 656-669, 2016.

SUTTON, D. et al. Efficient suppression of secretory clusterin levels by polymer-siRNA nanocomplexes enhances ionizing radiation lethality in human MCF-7 breast cancer cells in vitro. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 2, p. 155-162, 2006.

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.

WANG, P.H. et al. RNase If -treated quantitative PCR for dsRNA quantitation of RNAi trait in genetically modified crops. **BMC Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 1-12, 2018.

ZHANG, K. et al. Analysis of RNA interference (RNAi) biopesticides: Double-stranded RNA (dsRNA) extraction from agricultural soils and quantification by RT-qPCR. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 8, p. 4893-4902, 2020.

ZHANG, X., ZHANG, J., ZHU, K.Y. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). **Insect Molecular Biology**, v. 19, n. 5, p. 683–693, 2010.