

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM
DEFESA AGROPECUÁRIA

**ALTERAÇÕES PROTEICAS E FISIOLÓGICAS
INDUZIDAS POR *Diaphorina citri* KUWAYAMA EM
GENÓTIPOS DE CITROS**

Samille Andrade Aguiar

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2016**

**ALTERAÇÕES PROTEICAS E FISIOLÓGICAS INDUZIDAS POR
Diaphorina citri KUWAYAMA EM GENÓTIPOS DE CITROS**

Samille Andrade Aguiar
Engenheira Agrônoma
Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, 2011

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação do curso de Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Defesa Agropecuária.

Orientadora: Pro.f^a Dra. Marilene Fancelli
Coorientadora: Prof.^a Dra. Fabienne Florence Lucienne Micheli

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

A282a	<p data-bbox="683 1352 1075 1458">Aguiar, Samille Andrade. Alterações protéicas e fisiológicas induzidas por <i>Diaphorina citri</i> Kumayama em genótipos de citros / Samille Andrade Aguiar. _ Cruz das Almas, BA, 2016. 65f.; il.</p> <p data-bbox="683 1473 1075 1536">Orientadora: Marilene Fancelli. Coorientadora: Fabienne Florence Lucienne Micheli.</p> <p data-bbox="683 1552 1075 1615">Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p data-bbox="683 1630 1075 1736">1.Frutas cítricas – Cultivo. 2.Citros – Doenças e pragas – Controle. 3.Pragas agrícolas – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p data-bbox="884 1738 970 1760">CDD: 634.3</p>
-------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA
AGROPECUÁRIA**

**ALTERAÇÕES PROTEICAS E FISIOLÓGICAS INDUZIDAS POR
Diaphorina citri KUWAYAMA EM GENÓTIPOS DE CITROS**

**Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Samille Andrade Aguiar**

Aprovada em 15 de junho de 2016

Prof.^a Dra. Marilene Fancelli
EMBRAPA - Orientadora

Prof.^aDra. Suely Xavier de Brito Silva
Agência de Defesa Agropecuária da Bahia-ADAB
Examinadora interna ao programa

Prof.^a. Dra Nicolle de Carvalho Ribeiro
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Examinadora externa ao programa

DEDICATÓRIA

A Mário e Marlene, meus mestres, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradecer não é tão fácil quando se trata de vitórias, pois em cada luta que vencemos, contamos com a contribuição de muitos.

A Deus acima de todas as coisas, pois me deu o dom da vida e a capacidade de aprender cada dia mais, Ele que me proporcionou cruzar seres maravilhosos no meu caminho, que me trouxeram até aqui.

À UFRB, pela oportunidade de aprender e me desenvolver na área de estudo que admiro dentro do meu âmbito profissional.

À EMBRAPA, pela oportunidade de desenvolver a pesquisa em suas instalações e ceder seus profissionais para assistir meu experimento, como Bizunga, seu Zé Carlos, Pedro Lucena, Dilson e outros.

À UESC, pela disponibilidade dos laboratórios para realização das análises, em especial à Dra Fabienne Michelli e Tahise Magalhães, peça fundamental no processo laboratorial.

À Dra. Marilene Fancelli, pela paciência e disseminação de sua inteligência fora do comum.

A meus pais, Mário e Marlene, pela riqueza de conhecimentos que sempre me proporcionaram, se preocupando com “o que eu ia ser quando crescer”, não deixando faltar uma boa escola e um excelente lar, (pois acredito que não há bons professores se seus mestres não vierem de casa) me dando base para meus pilares que busquei construir.

A Selen e Lucas Aguiar, pessoas as quais me fazem entender cada dia a importância do saber.

A meu companheiro, Vitor Bandeira Martins Matos, pela compreensão, apoio, companheirismo e parceria.

E por fim, o meu amor maior, a razão da minha vida, pela compreensão, apesar de tão pequeno, pelo amor imensurável, por entender minhas necessidades de estudo, por simplesmente existir: João Guilherme!

EPIGRAFE

“só levo a certeza de que muito pouco eu sei, nada sei
é preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz pra
poder sorrir é preciso a chuva para florir.”

Almir Sater – Tocando em frente

ALTERAÇÕES PROTEICAS E FISIOLÓGICAS INDUZIDAS POR *DIAPHORINA CITRI* KUWAYAMA EM GENÓTIPOS DE CITROS

RESUMO: *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) apresenta grande importância econômica como vetor do *Huanglongbing* (HLB), doença altamente limitante à produção de citros no mundo. Conhecimentos acerca da interação entre vetor e planta hospedeira e que possam interferir no processo de transmissão da doença são fundamentais para o estabelecimento de programas de defesa fitossanitária. Assim, esse trabalho foi desenvolvido com os objetivos de determinar alterações no perfil de proteínas em resposta à infestação por adultos de *D. citri* em genótipos de citros e de avaliar mudanças nos parâmetros fisiológicos de folhas sadias e infestadas pelo inseto em plantas submetidas a déficit hídrico. Os genótipos de citros avaliados foram um porta-enxerto ('Sunki Maravilha') e uma copa ('Valência'). As plantas foram submetidas à infestação por *D. citri* durante cinco dias. Para avaliação das alterações proteicas, proteínas totais foram extraídas das amostras em condições desnaturantes e submetidas à eletroforese bidimensional. Mais de 300 spots foram detectados em ambos os genótipos, com massa molecular entre 14 e 97 KDa. Conclui-se que os genótipos exibem perfis proteicos distintos, observando-se proteínas exclusivas após infestação por *D. citri*. Para avaliação das alterações fisiológicas, utilizou-se o analisador de gás a infravermelho (IRGA). Para condutância estomática, verificou-se interação significativa entre déficit hídrico e nível de infestação. Conclui-se que a infestação por *D. citri* reduz a condutância estomática de plantas sob estresse hídrico.

Palavras chaves: *Citrus* spp; defesa fitossanitária; melhoramento; vetor do Huanglongbing.

ABSTRACT

PROTEOMIC AND PHYSIOLOGICAL CHANGES INDUCED BY *Diaphorina citri* KUWAYAMA IN CITRUS GENOTYPES

Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) presents a great economic importance as a vector of *Huanglongbing* (HLB), disease highly limiting to the citrus production worldwide. Knowledge about vector and host plant interaction that can interfere in the process of disease transmission are basic for the implementation of phytosanitary defense programs. Thus, this research was developed aiming to determine changes in the protein profiles in response to the infestation by *D. citri* adults in citrus genotypes and to evaluate changes in the physiological parameters in leaves submitted or not to the infestation by the insect under hydric stress. The genotypes evaluated were a rootstock ('Sunki Maravilha') and a scion ('Valência'). The plants were submitted to the infestation by *D. citri* adults for 5 days. For protein changes evaluation, total proteins were extracted from the samples under denaturing conditions and submitted to two-dimensional electrophoresis. More than 300 spots were detected in both genotypes, with molecular weight between 14 and 97 KDa. It is concluded that the studied genotypes exhibit distinct protein profiles and exclusive proteins profiles after *D. citri* infestation were observed in both genotypes. For evaluating physiological parameters, an infrared gas analyzer (IRGA) was used. It was observed a significant interaction between hydric deficit and infestation level for stomatal conductance. It is concluded that *D. citri* infestation reduces the stomatal conductance in plants under hydric stress.

Keywords: *Citrus* spp; phytosanitary defense; plant breeding; vector do Huanglongbing.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Média de adultos de <i>D. citri</i> /gaiola após cinco dias de confinamento e porcentagem de insetos vivos e mortos.....	59

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Produção brasileira de frutas por estado	15
Figura 2 (A e B). Micrografias da bactéria <i>Candidatus Liberibacter</i> spp. presente em vasos de floema de vinca (<i>Catharantus roseus</i>)	20
Figura 3. Sintoma de mosqueamento das folhas em citros devido à infecção pelo LB	21
Figura 4. Frutos cítricos sadios (à esquerda) e frutos menores infectados pelo HLB (à direita)	21
Figura 5. Adulto (A) e ninfa (B) de <i>Diaphorina citri</i>	22
Figura 6. Planta de murta (<i>Murraya paniculata</i>)	23
Figura 7. Planta de severínia (<i>Severinia buxifolia</i>)	23
Figura 1 - Gel 2D de proteínas de tecido foliar em 'Sunki Maravilha' sob condição controle (A) e infestada com <i>Diaphorina citri</i> (B). As proteínas indicadas por setas tiveram sua abundância diferencialmente alterada pela infestação do inseto. As proteínas indicadas por círculos são exclusivas do tratamento	40
Figura 2 - Gel 2D de proteínas de tecido foliar em 'Valência' sob condição controle (A) e infestada com <i>Diaphorina citri</i> (B). As proteínas indicadas por setas tiveram sua abundância diferencialmente alterada pela infestação do inseto. As proteínas indicadas por círculos são exclusivas do tratamento	41
Figura 1. Perda de umidade dos substratos cultivados com genótipos de citros 'Valência' e 'Sunki Maravilha' em função do tempo	55
Figura 2. (A) Taxa de transpiração de plantas de citros submetidas ao estresse hídrico e controle (não estressadas), infestadas ou não por adultos de <i>D. citri</i> . (B). Taxa de transpiração de plantas de citros no início e final da infestação no período de cinco dias por adultos de <i>D. citri</i> . Letras distintas acima das colunas indicam que os tratamentos diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)	56
Figura 3. Condutância estomática de plantas de citros não submetidas ao estresse hídrico (A) e estressadas (B), infestadas ou não por adultos de <i>D. citri</i> . Letras distintas acima das colunas indicam que os tratamentos diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)	57

Figura 4. Taxa de fotossíntese de plantas de citros não submetidas ao estresse hídrico (A) e estressadas (B), infestadas ou não por adultos de *D. citri*. Letras distintas acima das colunas indicam que os tratamentos diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

LISTA DE ABREVIATURAS

1 DE	<i>One-dimensional electrophoresis</i>
2 DE	<i>Two-dimensional electrophoresis</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FUNDECITRUS	Fundo de Defesa da Citricultura
HLB	<i>Huanglongbing</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPG -	<i>Immobilized pH gradient</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
PAM	Produção Agrícola Municipal
TCA	Acido tricloroacético
KDA	Kilodawton

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 IMPORTÂNCIA DA CITRICULTURA NO BRASIL	18
3.2 IMPACTOS DO <i>HUANGLONGBING</i> NA CITRICULTURA	19
3.3 <i>HUANGLONGBING</i> : AGENTE CAUSAL	20
3.4 O VETOR DO <i>HUANGLONGBING</i> : <i>Diaphorina citri</i> KUWAYAMA	22
3.5 MANEJO DO <i>HUANGLONGBING</i> .	23
3.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS	24
3.7 ANÁLISES FISIOLÓGICAS	26
ARTIGO 1	28
ARTIGO 2	42
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS	61

INTRODUÇÃO

As espécies de citros chegaram às Américas no final do século XV, originárias das regiões tropicais e subtropicais da Ásia e do arquipélago malaio. A partir de então, passaram a ser cultivadas em todas as regiões que apresentavam clima favorável às plantas, expandindo-se em todos os continentes, exceto a Antártida, sustentando o segmento da agroindústria e do agronegócio cítrico em vários países (SOBRINHO et al., 2013).

Na agricultura brasileira, a laranja continua no topo da lista entre as principais frutas produzidas, principalmente no estado de São Paulo, onde, dos 15 milhões de toneladas de frutas frescas, 90% (cerca de 12 milhões de toneladas) correspondem à produção de laranja. Também se destaca na produção de lima ácida Tahiti e tangerinas, como a Ponkan e o tangor Murcott. O segundo estado produtor de laranja é a Bahia, com produção de cerca de 1 (hum) milhão de toneladas (Figura 1) (ABF, 2015; IBGE, 2014; LOPES et al., 2011).

A laranja é cultivada em praticamente todos os estados brasileiros, ocupando mais de 800 mil ha, o que corresponde a uma área 20 vezes maior do que os pomares de maçã, 10 vezes maior do que os plantios de manga e quase o dobro das áreas cultivadas com banana (NEVES et al., 2010).

O país ocupa a primeira colocação na exportação de suco de laranja, e é responsável por 60% da produção mundial do produto. O principal comprador da bebida brasileira é a União Europeia, que aumenta significativamente o percentual de importação a cada ano (MAPA, 2014; AZEVÊDO, 2013).

De acordo com Lopes et al., (2011), o domínio mundial de mercado que a citricultura brasileira detém é responsável por impulsionar o crescimento socioeconômico do país, contribuindo com a balança comercial nacional e atuando principalmente como geradora de empregos na área rural, direta e indiretamente.

Figura 1. Produção brasileira de frutas por estado.

OS ESTADOS DAS FRUTAS – Fruit states			
Produção brasileira de frutas por Estado (toneladas)			
ESTADOS	2013	2014	PRINCIPAIS FRUTAS
São Paulo	15.977.390	15.183.288	(laranja 12.290.107)
Bahia	3.814.389	4.058.678	(banana 1.088.647, laranja 1.026.167, mamão 794.565, manga 430.594 e maracujá 381.192)
Rio Grande do Sul	2.356.173	2.399.633	(uva 812.517 e maçã 690.422)
Minas Gerais	2.304.393	2.299.823	(laranja 940.444 e banana 711.397)
Paraná	1.648.424	1.567.181	(laranja 979.682)
Santa Catarina	1.383.267	1.519.070	(banana 701.484 e maçã 633.079)
Pernambuco	933.629	975.010	(banana 396.470, uva 236.179 e manga 218.679)
Pará	861.038	869.703	(banana 588.655)
Espírito Santo	778.700	847.770	(mamão 399.790)
Ceará	796.115	791.593	(banana 452.541)
Sergipe	756.606	734.722	(laranja 614.227)
Subtotal	31.610.124	31.246.471	
Demais estados	2.143.048	2.043.334	
Total	33.753.172	33.289.805	

Mais de 200 mil empregos, diretos e indiretos são gerados pelo setor citrícola em centenas de empresas diretamente ligadas ao setor, em milhares de propriedades rurais, recolhendo impostos, movimentando estabelecimentos nas principais regiões de produção, visto que a cultura está presente em mais de 3.000 municípios brasileiros (NEVES et al., 2010).

No ano de 2004, sintomas do *Huanglongbing* (HLB) ou *ex greening* foram verificados em pomares cítricos de cidades do estado de São Paulo, sendo o primeiro caso no continente americano (TEIXEIRA, et al., 2005).

Causado por procarionte de importância quarentenária, o HLB é a doença mais destrutiva dos citros, pois ataca praticamente todas as espécies comerciais, independente de copa ou porta-enxerto e não tem cura. Três espécies do agente causal *Candidatus Liberibacter* (Rhizobiales: Phyllobacteriaceae) foram identificadas: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter americanus* e *Candidatus Liberibacter africanus*. Os vetores naturais da bactéria são os psilídeos *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Hemiptera; triozidae) e *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera; liviidae), esse último é o vetor presente no Brasil (BOVÉ, 2006; MANJUNATH et al., 2008; SUGAYAMA et al., 2015).

O HLB é responsável pelo amarelecimento das folhas, limitação produtiva da planta, redução do *stand*, causando perda na produtividade bem como pela depreciação dos frutos para comercialização (WU et al., 2009; SUGAYAMA et al., 2015).

Em levantamento realizado pelo Fundecitrus, entre outubro de 2014 e março de 2015, constatou-se a presença de cerca de 35 milhões de plantas infectadas pela doença. Adicionalmente, relatou-se a redução do número de plantas erradicadas devido ao HLB em São Paulo e Minas Gerais. Esses dados são alarmantes, visto que indicam que as plantas infectadas não estão sendo erradicadas com o devido rigor possibilitando a disseminação da bactéria.

Essa falta de controle produzirá impactos significativos em médio prazo, pois as plantas perderão sua capacidade de produção à medida que os sintomas evoluírem, o que levará à queda na produtividade e competitividade no mercado (RIBAS et al., 2016). Algumas estratégias de controle são utilizadas visando mitigar a doença, como utilização de mudas e borbulhas saudáveis, produção de mudas em viveiros protegidos com tela antiafídica, monitoramento constante de plantas sintomáticas, erradicação de plantas infectadas e controle dos psilídeos (BOVÉ, 2006; GIRARDI et al., 2011; GRAFTON-CARDWELL et al., 2013).

Nas áreas onde ocorre o HLB, o controle químico do vetor é feito quase que semanalmente, aumentando os riscos de intoxicação e de presença de resíduos nos frutos. Assim, métodos alternativos de controle de baixo impacto ambiental são requeridos.

Sabendo-se que plantas infestadas podem alterar seu metabolismo visando à produção de compostos de defesa, o conhecimento das interações entre planta hospedeira e vetor, com base nas respostas no perfil proteico das plantas, é importante para avaliar o efeito do inseto sobre o hospedeiro.

Considerando que a ocorrência do inseto está condicionada à presença de fluxos de brotação, as respostas fisiológicas da planta ao inseto podem ser alteradas em função de estresse de natureza abiótica, como o estresse hídrico. Assim, o estudo das interações entre *D. citri* e seu hospedeiro, com base nas diferenças no perfil proteico de genótipos de citros e nas respostas fisiológicas da planta ao ataque do inseto, pode contribuir ao avanço do conhecimento útil ao desenvolvimento de alternativas de manejo da praga.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho teve como objetivo identificar alterações proteicas e fisiológicas induzidas por *Diaphorina citri* em dois genótipos de citros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos alcançados com esse estudo foram:

- Determinar alterações no perfil de proteínas relacionadas a respostas à infestação pelo psílídeo *D. citri*, em genótipos de citros (porta-enxerto 'Sunki Maravilha' - *Citrus sunkii* ex Tan. e copa 'Valência' - *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.
- Avaliar as mudanças nos parâmetros fisiológicos de folhas saudáveis e infestadas por *D. citri* em genótipos de citros (porta-enxerto 'Sunki Maravilha' e copa 'Valência') submetidos a déficit hídrico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 IMPORTÂNCIA DA CITRICULTURA NO BRASIL

A história da citricultura está relacionada aos primórdios do país, quando, ainda no período de 1500, após a descoberta do Brasil, as primeiras sementes de laranja doce foram introduzidas pelos portugueses nos Estados da Bahia e São Paulo (EMBRAPA, 2003).

Ainda nos tempos atuais, a laranja continua encontrando condições favoráveis para seu desenvolvimento, levando-se em consideração que a fruticultura é uma atividade presente em todos os estados brasileiros, tendo variações em espécies cultivadas e produção. O estado de São Paulo destaca-se como o maior produtor de frutas frescas, tendo como carro-chefe a laranja; o segundo estado brasileiro produtor de laranja é a Bahia (ABF, 2016).

De acordo com Neves et al. (2010), a alta qualidade do suco de laranja brasileiro o tornou conhecido mundialmente, fazendo com que o Brasil detenha 53% da produção mundial e tornando-se o maior exportador, atingindo 98% na exportação dessa produção.

A importância da citricultura no setor econômico e social no Brasil é expressa em números: aproximadamente 1 (hum) milhão de hectares de área plantada (t/ha) e produção de frutas superior a 19 milhões de toneladas, resultando cerca de 1,5 bilhões de dólares anuais na economia do país. No estado de São Paulo, o setor citrícola gera mais de 500 mil empregos diretos e indiretos (EMBRAPA, 2003).

Apesar da baixa rentabilidade ocasionada pela estiagem no final de 2014, entre outros fatores relevantes como o HLB, o Brasil é o único país que consegue atender seus principais clientes: União Europeia e Estados Unidos. Dos concorrentes do Brasil, os Estados Unidos enfrenta sérios problemas com o HLB, tendo sua produção reduzida anualmente, e a China dá preferência ao consumo nacional e não à exportação (ABF, 2016).

Dentre as cultivares utilizadas na citricultura nacional, a laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) destaca-se na produção e comercialização de suco, sendo também bastante consumida *in natura*. É utilizada como copa, pois possui um teor elevado de suco, excelente sabor e coloração atraente do fruto.

Do ponto de vista comercial, é uma das principais cultivares de laranja doce comercializadas pelos grandes e pequenos produtores (BLUMER et al., 2006). Entre os principais porta-enxertos cítricos comerciais, destaca-se a tangerina ‘Sunki Maravilha’ (*Citrus sunkii* ex Tan.), indicada em combinações com copas de laranja doce, conferindo às mesmas elevado vigor e produtividade de frutos, de qualidade compatível à verificada em copas enxertadas em limoeiro ‘Cravo’. Esse genótipo é sensível à escassez de água, e apresenta tolerância a doenças, declínio dos citros, salinidade e a morte súbita dos citros (AZEVEDO, 2013).

3.2 IMPACTOS DO HUANGLONGBING NA CITRICULTURA

A fitossanidade está diretamente ligada à economia em termos gerais e, portanto, ao agronegócio da citricultura. Os prejuízos que as pragas e doenças causam à produção podem acarretar abandono de propriedades, consequentemente impactos na geração de renda de uma região e êxodo rural, desestabilizando a balança comercial do país (SUGAYAMA et al., 2015).

A citricultura baiana apresenta uma grande vantagem quando comparada à paulista, em vista da ausência do HLB na Bahia, permitindo a expansão do seu mercado, inclusive de frutos *in natura*. Por sua vez, o estado de São Paulo foi o primeiro no país a detectar o HLB, o que fez com que os custos de produção de citros aumentassem, colocando em risco a sustentabilidade do agronegócio (SILVA, 2008).

De acordo com Oliveira et al. (2013), na iminência de entrada do HLB na Bahia, na ausência de medidas de controle, cenários projetados para 20 anos apontam prejuízos superiores a 1,8 bilhão de reais na economia do estado, com base no percentual de perdas e em preços médios pagos aos produtores. Para o estado de São Paulo, as projeções para 20 anos apontam prejuízos estimados entre 13 a 20 bilhões de reais, tomando-se como base o potencial de redução da produtividade, a diminuição da densidade dos pomares e a erradicação de plantas infectadas pelo HLB (SUGAYAMA et al., 2015).

Com *status* de área livre do HLB, a Bahia, como segundo produtor nacional de citros, atrai vários investidores do agronegócio, porém, com a presença do inseto vetor do HLB em seu território e de seu hospedeiro alternativo, *Murraya*

paniculata, o estado deve ficar em alerta fitossanitário para evitar a introdução da doença (ALMEIDA, 2012).

3.3 HUANGLONGBING (HLB): AGENTE CAUSAL

Agente causal do HLB, a bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. (Rhizobiales: Phyllobacteriaceae) (Figura 2) tem três espécies associadas à doença: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *C. L. americanus* e o *C. L. africanus*, considerando que as espécies asiática e americana estão presentes no Brasil (BOVÉ, 2006; BELASQUE JÚNIOR et al., 2009; MACHADO et al., 2010).

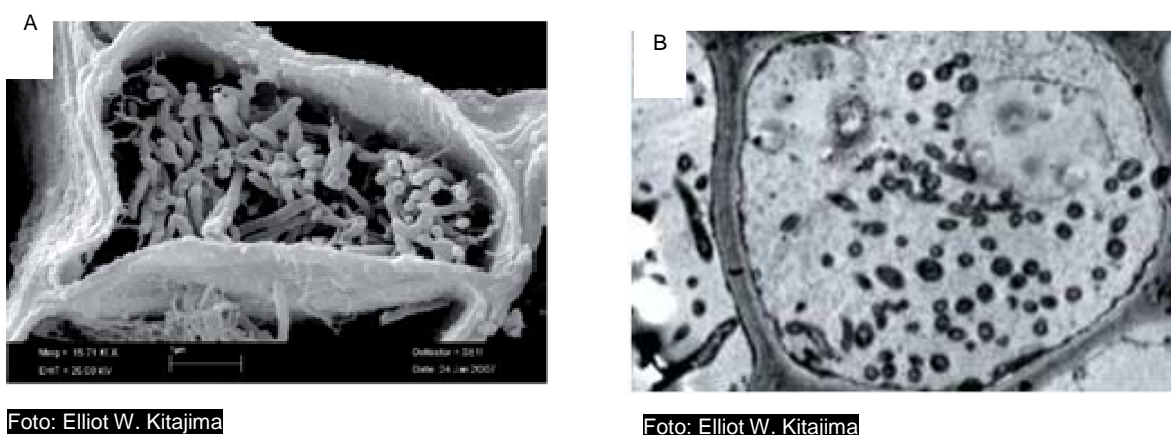


Foto: Elliot W. Kitajima

Foto: Elliot W. Kitajima

Figura 2 (A e B). Micrografias da bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. presente em vasos de floema de vinca (*Catharantus roseus*). Fonte: Tanaka et al. (2007).

Em estudos relacionados à codificação de genes, verificou-se que a bactéria *C. Liberibacter* depende exclusivamente da interação de simbiose com o hospedeiro, para seu metabolismo funcionar, compartilhando assim, recursos nutricionais e proteínas essenciais para a manutenção da vida dos indivíduos (VYAS et al., 2015).

A disseminação da doença é causada provavelmente pelo período de incubação na planta, ou seja, período desde a transmissão até o aparecimento dos sintomas, que pode durar de meses a um ano (BASSANEZI et al., 2010), caracterizando-a como uma doença silenciosa. Por causa disso, plantas infectadas podem se manter assintomáticas por um longo período, concorrendo para a disseminação da bactéria e dificultando o manejo do pomar.

Praticamente todas as espécies comerciais de citros são atingidas pelo HLB, tornando-se a mais destrutiva doença no âmbito da citricultura (BOVÉ, 2006). Em plantas de citros infectadas, os sintomas típicos em folhas incluem mosqueamento (Figura 3), amarelecimento, manchas assimétricas e nervuras proeminentes e corticosas, mosqueado assimétrico do limbo foliar e deformação (chamada de “orelha de coelho”). Em frutos, os sintomas são assimetria, amarelecimento da região próxima ao pedúnculo, deformação da columela (Figura 4) e abortamento de sementes. Na planta, em geral, ocorre queda de frutos e morte de ponteiros (GIRARDI et al., 2011; MAFRA et al., 2013).

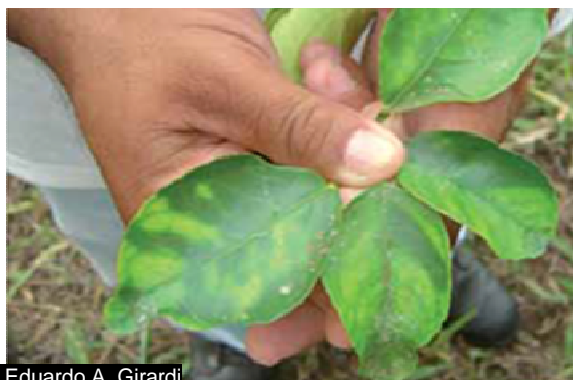


Foto: Eduardo A. Girardi

Figura 3. Sintoma de mosqueamento das folhas em citros devido à infecção pelo HLB. Fonte: Girardi et al. (2011).



Foto: Eduardo A. Girardi

Figura 4. Frutos cítricos saudáveis (à esquerda) e frutos menores infectados pelo HLB (à direita). Fonte: Girardi et al. (2011).

Apesar de a doença apresentar inicialmente lesões nas folhas, estudos revelaram que a infecção pela bactéria é generalizada em todo o tecido do floema (JOHNSON et al., 2014).

3.4 O VETOR DO HLB: *Diaphorina citri* KUWAYAMA

Duas espécies de psílídeos são hospedeiros vetores da bactéria: *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Hemiptera: Triozidae) e *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Figura 5), sendo este último o vetor presente no Brasil desde 1942 (BOVÉ, 2006; MANJUNATH et al., 2008; SUGAYAMA et al., 2015). Segundo Teixeira et al. (2005), nos Estados Unidos, o psílideo é considerado como objeto de bioterrorismo, devido ao seu alto poder de destruição dos pomares.



Figura 5. Adulto (A) e ninfa (B) de *Diaphorina citri*.

Adultos e ninfas de *D. citri* em todos os estágios podem transmitir o patógeno do HLB ao se alimentarem de uma planta infectada por pelo menos 30 minutos (WU et al., 2009), entretanto a eficiência de transmissão é mais alta quando o inseto adulto adquire a bactéria quando na fase de ninfa.

O ciclo de ovo a adulto dura de 20 a 40 dias, dependendo do hospedeiro e das condições meteorológicas (BOVÉ, 2006; GRAFTON-CARDWELL, 2013). Com longevidade de 90 a 120 dias, o psílideo pode transmitir a bactéria fitopatogênica, que multiplica-se no interior do vetor, até a morte do inseto (GIRARDI et al., 2011).

O psílídeo possui inúmeros hospedeiros incluindo muitas espécies de citros, bem como a murta, *Murraya paniculata* (L.) Jack (Figura 6) e a severínia, *Severinia buxifolia* (Poir.) Ten. (Figura 7), além de ter voos curtos facilitando sua atividade de disseminação, ou ainda sendo carregado a longas distâncias por massas de ar (BASSANEZI et al., 2010; GIRARDI et al., 2011).



Foto: Eduardo A. Girardi

Figura 6. Planta de murta (*Murraya paniculata*).
Fonte: Girardi et al.,(2011).



Foto: Eduardo A. Girardi

Figura 7. Planta de severínia (*Severinia buxifolia*).Fonte: Girardi et al., (2011).

3.5 MANEJO DO HLB

De acordo com Manjunath et al. (2008), o HLB é uma doença de difícil manejo devido à natureza não específica dos sintomas, prolongado período de latência, distribuição irregular do patógeno, efeito do ambiente (especialmente temperatura) na expressão dos sintomas e multiplicação bacteriana, provável variação na tolerância tanto da planta hospedeira quanto do vetor à bactéria e natureza da bactéria. Assim, os autores discutem que uma das alternativas para redução dos prejuízos causados pelo HLB é o controle dos insetos vetores.

Inspeções periódicas são necessárias para detecção e eliminação de plantas, no máximo de 2 a 4 meses de intervalo (BELASQUE JÚNIOR et al., 2009), sendo que pomares com o percentual de plantas com sintomas de HLB for

superior a 28%, devem ser erradicados conforme INSTRUÇÃO NORMATIVA MAPA Nº 53, de 16 de Outubro de 2008.

Estudos de Gottwald (2010), afirmam que numa inspeção visual, para cada planta infectada sintomática, presume-se que há 54 plantas infectadas assintomáticas.

Quando uma praga quarentenária é introduzida e se estabelece em um território, o controle é uma ferramenta aliada à defesa vegetal, pois o mesmo ameniza os prejuízos causados pela praga (SUGAYAMA et al., 2015).

Em São Paulo, mais de 12 milhões de árvores foram erradicadas entre 2005 e 2011 (BASSANEZI et al., 2010). Apesar de imprescindível para o manejo do HLB, o elevado número de pulverizações (14 a 28/ano, às vezes até 54/ano) acarreta desequilíbrios diversos, aumento de custos e inviabilidade de adoção de certificações da qualidade da produção.

Assim, justifica-se a realização de pesquisas visando ao desenvolvimento de estratégias de controle do inseto vetor. O estudo das interações entre planta hospedeira e vetor utilizando-se as ferramentas de análise proteômica e fisiológica pode auxiliar no desenvolvimento de métodos mais sustentáveis de controle (GRAFTON-CARDWELL et al., 2013).

3.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS

Proteômica é o estudo da população de proteínas ou de uma específica que se expressa diferencialmente, presentes em um determinado tecido ou célula, em uma determinada etapa do desenvolvimento, em uma determinada condição abiótica e biótica se tem como objetivo avaliar fenotípica, quantitativa e qualitativamente e expressão de proteínas (MEIRELES, 2007).

A proteômica possibilita a identificação de prováveis modificações pós-tradução de proteínas e também pode testar se proteínas são traduzidas e acumuladas após a expressão dos genes que a codificam (BERTOLDE et al., 2014).

A identificação genética de uma estrutura importante, no processo de defesa contra pragas está intimamente ligada à identificação da matriz proteica dessa estrutura (MENDES, 2010).

A eletroforese é uma tecnologia agregada à proteômica; ela é uma técnica que separa proteínas em função de um campo elétrico a partir da migração das moléculas carregadas em uma solução, quanto maior a carga, maior será a velocidade da substância em relação à outra que possui menor carga (ROCHA et al., 2005).

A técnica da eletroforese bidimensional consiste em incubar o gel de IPG - *Immobilized pH gradient* - com a solução de uma amostra, a qual é submetida a um campo elétrico para a focalização isoelétrica ou primeira dimensão. As proteínas focalizadas são separadas de acordo com sua massa molecular a partir de uma segunda dimensão, onde o perfil bidimensional é visualizado após coloração por marcadores (SOUSA, et al., 2014).

O método de eletroforese bidimensional (2D) destaca-se por ser um estudo eficaz, que analisa misturas complexas de proteínas extraídas a partir de células, tecidos ou de outras amostras biológicas (GORG, 2004), a técnica tem sido uma das mais utilizadas para a separação de proteínas, pois a mesma consegue a partir de uma única amostra separar, identificar e quantificar inúmeras proteínas.

Na proteômica para se obter bons resultados, deve ser realizada uma preparação apropriada de amostras, estabelecer o melhor método de extração, precipitação e solubilização de proteínas de acordo com o tipo da amostra (RIVEROS et al., 2010).

Geralmente tecidos vegetais apresentam concentrações mais baixas de proteínas e níveis mais elevados de materiais que interferem nas extrações de proteínas (BERTOLDE et al., 2014).

Pirovani et al. (2008) desenvolveram um protocolo de extração de proteínas a partir de meristemas e folhas de cacau sob condições desnaturantes utilizando fenol/tampão, e SDS denso, em combinação com o processo de sonicação, que permite ser realizado em todos os tipos de material vegetal, onde as separações resultaram em géis com mínima contaminação e de alta resolução, adequado para os métodos de 1 DE e 2 DE.

Para que se possa entender melhor o processo de proteômica, ela pode ser dividida em três áreas; a primeira consiste na microcaracterização proteica, onde se identifica as proteínas e suas modificações pós-traducionais em larga escala, a segunda trata-se da manifestação da diferença para a comparação

dos níveis de proteínas com aplicação em uma ampla faixa de doenças, e por fim, o estudo das interações usando técnicas como espectrometria de massa (RIVEROS et al., 2010).

3.7 ANÁLISES FISIOLÓGICAS

Entre os fatores abióticos que afetam as plantas, o déficit hídrico atualmente é o que apresenta uma das maiores limitações à expansão de cultivo de citros. O déficit hídrico ocorre quando as raízes não conseguem suprir a parte aérea em relação à demanda de água, reduzindo a transpiração até níveis críticos (SAMPAIO, 2014). A água é transportada por meio do sistema solo, planta e atmosfera sendo controlada pelas resistências impostas pela raiz, caule, folha e estômato.

A deficiência hídrica afeta os parâmetros fisiológicos das plantas de citros, alterando a condutância estomática, transpiração e fotossíntese (MEDINA et al., 1999). Em situações de escassez de água, a produtividade da planta diminui devido à alteração no metabolismo da planta (NOGUEIRA et al., 2001). O estresse hídrico pode ocorrer pelo excesso ou deficiência de água. Em regiões do Nordeste brasileiro, o déficit hídrico é considerado o fator mais limitante ao crescimento, desenvolvimento e produtividade da planta (SUASSUNA et al., 2012).

A fim de controlar a deficiência hídrica em regiões semiáridas, é interessante a utilização de porta-enxerto com boas características de adaptações climáticas, com tolerância à seca e com diversidade de resposta à deficiência hídrica (SUASSUNA et al., 2012). Segundo Nogueira et al. (2001), genótipos de citros que apresentem resistência à deficiência hídrica se constituem em excelentes materiais para serem utilizados em combinações de porta-enxerto e copa. Essas combinações têm a finalidade de desenvolver a resistência da planta à escassez de água e permitir que o sistema fisiológico não seja afetado.

A relação parte aérea e raiz é bastante estudada, principalmente quando está relacionada ao déficit hídrico (MEDINA et al., 1999; CERQUEIRA et al., 2004; SAMPAIO, 2014). De acordo com Cerqueira et al. (2004), híbridos apresentam melhores respostas à tolerância à desidratação, mantendo as trocas gasosas e produção de massa seca.

Embora os sintomas do HLB sejam principalmente visualizados na parte aérea, o sistema radicular apresenta importante papel na disseminação da bactéria pela planta (JOHNSON et al., 2014).

Alguns trabalhos têm sido realizados avaliando-se essas interações, entretanto, em sua maior parte, o foco tem sido sobre o impacto da infestação de insetos nos processos fisiológicos vegetais (RETUERTO et al., 2004; LEMOS FILHO et al., 2007; BUENO et al., 2009).

Para *D. citri*, Malik et al. (2013) verificaram alterações no perfil proteômico (aminoácidos livres e poliaminas) em folhas de citros infestadas e submetidas a estresse hídrico, indicando o potencial de produção de compostos de defesa em resposta ao ataque da praga.

ARTIGO 1

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERÍODICO SCIENTIA AGRICOLA

COVER PAGE

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

Running title: Host plant and insect interaction

Manuscript category: Entomology

Protein changes induced by the Asian citrus psyllid in citrus genotypes

Samille Andrade Aguiar¹, Tahise Magalhães de Oliveira², Fabienne Florence Lucienne
Micheli^{2,3}, Marilene Fancelli^{4*}

¹ Federal University of Recôncavo of Bahia – Center of Agrarian, Environmental and
Biological Sciences – 44380-000 – Cruz das Almas, BA - Brazil

² State University of Santa Cruz – Biological Sciences Department – Molecular Biology
Laboratory - 45662900 - Ilhéus, BA – Brazil

³ French Agricultural Research Centre for International Development (CIRAD) - Cedex
5 – Montpellier - France

4 Embrapa Cassava & Fruits – Entomology Lab., C.P.007 – 44380-000 – Cruz das
Almas, BA - Brazil

*Corresponding author<marilene.fancelli@embrapa.br>

22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

Resumo

Alterações proteicas induzidas pelo psílideo dos citros em genótipos de citros

O psílideo *Diaphorina citri* Kuwayama é o vetor da doença conhecida como Huanglongbing (HLB), principal ameaça à citricultura mundial e que ainda não tem cura. Informações sobre a interação entre vetor e planta hospedeira podem contribuir para o avanço no desenvolvimento de métodos de manejo da praga. O objetivo do trabalho foi determinar alterações no perfil de proteínas relacionadas a respostas à infestação pelo psílideo em genótipos de citros (porta-enxerto ‘Sunki Maravilha’ e copa ‘Valência’). As plantas foram infestadas por *D. citri* à proporção de 15 insetos por gaiola. Após o período de cinco dias, as amostras de folhas foram coletadas e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C. Proteínas totais de tecido foliar foram extraídas das amostras em condições desnaturantes, sendo submetidas à eletroforese bidimensional. Foram detectados *spots* de proteínas com massa molecular entre 14 e 97 KDa. Em ‘Sunki Maravilha’, 648 *spots* foram identificados, sendo 62 comuns, 249 exclusivos do tratamento com infestação e 337 exclusivos do controle. Para Valência’, 543 *spots* foram detectados, sendo 129 comuns a ambos os tratamentos, 191 exclusivos para folhas infestadas e 223 exclusivos da condição controle. Os genótipos exibem perfis proteicos diferenciados mostrando diferentes intensidades entre os tratamentos. Além disso, proteínas únicas são observadas em ambos os genótipos após infestação por *D. citri*. Análises adicionais são necessárias para melhor compreensão das respostas da planta ao inseto.

Palavras-chave: *Diaphorina citri*, eletroforese bidimensional, proteômica.

44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

Abstract

Proteic changes induced by the asian citrus psyllid in citrus genotypes

Rationale _____ The psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama is the disease vector of Huanglongbing (HLB), the main threat to citrus crop worldwide and with a unknown cure. Knowledge about the host plant and the vector interaction may contribute for developing methods of integrated management of this pest.

Objective _____ The objective of this work was to determine changes in the protein profil related to responses to the psyllid infestation in citrus genotypes (a rootstock ‘Sunki Maravilha’ and a scion ‘Valência’).

Methods _____ The plants were infested by *D. citri* at the proportion of 15 insects per cage. After five days, samples of leaves were collected and stored in ultra-

56 freezer at -80 °C. Total protein of leaf tissue were extracted from the sample under
57 denaturing conditions, and subjected to two-dimensional electrophoresis.

58 Results _____ The protein spots presented molecular weight between 14 and
59 97 KDa. In ‘Sunki Maravilha’, 648 spots were identified, 62 common to treatments, 249
60 exclusive for infested treatment and 337 for control. For ‘Valência’, 543 spots were
61 observed, 129 common to both treatments, 191 exclusive for infested leaves and 223 for
62 control.

63 Conclusion_____ The genotypes exhibit different protein profiles showing
64 differential intensities between treatments. Moreover, unique proteins were observed in
65 both genotypes after infestation by *D. citri*. Further analysis is needed to better
66 understand plant responses to the insect.

67

68 Keywords: *Diaphorina citri*, two-dimensional electrophoresis, proteomics.

69

70

Introdução

71 A citricultura mundial vem sendo ameaçada pelo *Huanglongbing* (HLB), doença cujo
72 agente causal é a bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. Plantas infectadas apresentam
73 coloração amareladas nas folhas, redução de produtividade e alteração na qualidade dos
74 frutos, com graves consequências socioeconômicas aos produtores (Bové, 2006;
75 Grafton-Cardwell et al., 2013; Manjunath et al., 2008). Essas bactérias são restritas ao
76 floema e podem ser transmitidas por material vegetal infectado ou por psilídeos
77 infectivos: *Trioza erytrae* (Del Guercio) (Hemiptera:Trioziidae) e *Diaphorina citri*
78 Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), o qual ocorre no Brasil como vetor (Bové, 2006;
79 Grafton-Cardwell et al., 2013). Após a infecção, os sintomas do HLB podem se
80 manifestar em um período de tempo que varia de alguns meses a quase dois anos
81 dependendo de alguns fatores como o genótipo, a idade das plantas e seu estágio
82 fenológico e a época do ano (Grafton-Cardwell et al., 2013; Mafra et al., 2013), o que
83 dificulta o seu manejo.

84 Tendo em vista que a maior incidência de plantas visualmente sintomáticas é observada
85 entre o final do verão e início da primavera, sendo que a máxima detecção ocorre entre
86 outono e o inverno (Bassanezi et al., 2010).

87 Considerando que a doença não tem cura e que pode afetar todas as variedades de citros,
88 a melhor estratégia é evitar sua entrada nas regiões ainda livres do HLB com barreiras
89 quarentenárias eficientes. Nas regiões onde já ocorre, atualmente, os pilares para o seu

90 manejo estão embasados no controle do vetor, usualmente químico, associado à
91 utilização de mudas produzidas em viveiros telados e erradicação de plantas
92 sintomáticas. Entretanto, os prejuízos causados ao longo dos anos só vêm aumentando
93 (Bové, 2006; Grafton-Cardwell et al., 2013). Novas abordagens sobre as interações
94 entre planta e vetor são necessárias visando ao desenvolvimento de estratégias de
95 manejo do HLB (Mafra et al., 2013; Nwugo et al., 2013; Ranulfi et al., 2016; Vyas et
96 al., 2015; Yan et al., 2013). Os mecanismos de defesa das plantas contra o ataque de
97 insetos é muito complexo e envolve, comumente, a produção e secreção de proteínas ou
98 metabólitos de defesa, muitas vezes distribuídos em partes não infestadas na mesma
99 (Das et al., 2013; Witzany, 2006). Diferenças nos perfis de expressão de proteínas
100 podem explicar os processos moleculares e fisiológicos envolvidos com a infestação por
101 *D. citri* (Malik et al., 2013) ou mesmo pela infecção pelo HLB (Nwugo et al., 2013).
102 Assim, esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de identificar possíveis alterações
103 proteicas induzidas por *D. citri* em genótipos de citros que possam ser úteis em
104 programas de manejo da praga.

105

106

Material e métodos

107

Infestação por adultos de *D. citri*

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

Coleta e armazenamento das amostras

119

120

121

122

Inicialmente, uma amostra composta de quatro folhas de citros de quatro plantas (16 folhas formando um *pool*) foi coletada por genótipo e por tratamento (sem e com insetos) antes da infestação (tempo zero), e mantidas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenadas em ultrafreezer a -80°C.

123 A infestação com adultos de *D. citri* foi feita um dia após a coleta inicial, utilizando-se
124 gaiolas de *voil*, de folhas, conforme anteriormente mencionado (tempo zero). Quatro
125 plantas de cada genótipo foram mantidas sem infestação e constituíram a testemunha
126 para o experimento.

127 Após o período de cinco dias (Malik et al., 2013), os insetos foram removidos das
128 gaiolas e as amostras de folhas infestadas e não infestadas (testemunha) foram coletadas
129 e mantidas em nitrogênio líquido (tempo cinco). Posteriormente, foram armazenadas em
130 ultrafreezer a -80°C e liofilizadas.

131 **Extração de proteínas**

132 Proteínas totais de tecido foliar de citros foram extraídas em condições desnaturantes
133 segundo Pirovani et al. (2008). Um *pool* formado por dezesseis folhas jovens (quatro
134 folhas de quatro plantas por tratamento) provenientes de plantas de citros foi macerado
135 em nitrogênio líquido e cerca de 0,3 g de pó foram ressuspensos em acetona 100% e
136 centrifugados a $10.000 \times g$ por 10 minutos. O precipitado foi novamente lavado com o
137 mesmo volume de acetona 100% e centrifugado, sob as mesmas condições. Logo após,
138 o precipitado foi mantido em temperatura ambiente para secar. Foram feitas contínuas
139 lavagens com ácido tricloroacético 10% em acetona – TCA, para despigmentação do
140 material, sendo que, a cada lavagem, o *pellet* foi ressuspensão por sonicação em
141 ultrassonicador de sonda (Gex 130, 130 W). Então, uma lavagem com TCA 10 % em
142 água foi realizada e a amostra foi submetida à sonicação e, por fim, a amostra foi lavada
143 com acetona 80%. Posteriormente, o *pellet* foi solubilizado com tampão SDS-denso
144 (sacarose 30%, SDS 2%, $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ Tris*-HCl pH 8,0, 2-mercaptoetanol 5%) e
145 submetido à sonicação.

146 Um volume de fenol pH 8,0 foi adicionado e incubado por 30 minutos, sob agitação em
147 temperatura ambiente e centrifugado por 10 minutos a $5000 \times g$. As proteínas da fase
148 fenólica foram extraídas com lavagens consecutivas com tampão SDS denso e
149 incubados por 14 h a -20°C com cinco volumes de acetato de amônio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em
150 metanol.

151 A amostra de $20000 \times g$ foi centrifugada por cinco minutos e lavadas três vezes com
152 acetato de amônio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em metanol, duas vezes com acetona e uma vez com
153 etanol 70%. Finalmente, as amostras foram colocadas em temperatura ambiente para
154 secar e foram armazenadas em freezer -20°C .

155 As proteínas foram quantificadas usando o kit 2D Quant, de acordo com as
156 recomendações do fabricante (GE Healthcare). A concentração da proteína foi ajustada

157 a 1 mg.ml⁻¹ e 400 µg foram usados no gel de eletroforese bidimensional. A análise
158 comparativa de perfis proteicos de tecido foliar foi realizada por meio de eletroforese
159 bidimensional.

160 **Eletroforese bidimensional (2-D)**

161 Aproximadamente 400 µg de proteínas foram dissolvidas em 350 µl de tampão de
162 reidratação e aplicadas em *strips* de 13 cm, com gradiente de pH imobilizado (*IPG-*
163 *immobilized pH gradient*) entre 4-7 e depois submetidas na unidade de Focalização
164 Isoelétrica (*EthanIPGphor III*). A segunda dimensão foi realizada em gel de
165 poliacrilamida 12,5% no sistema de eletroforese vertical HOEFER SE 600 Ruby
166 (Amersham Bioscience). Os *spots* de proteínas foram visualizados por impregnação
167 com corante Azul de Coomassie Brilhante (Neuhoff et al., 1988). Para isso, após a
168 eletroforese os géis de poliacrilamida foram colocados em tampão de fixação (etanol
169 40% e ácido acético 10%) por 1 h, em seguida este tampão foi substituído pelo corante
170 azul de Coomassie coloidal (sulfato de amônio 8%, ácido fosfórico 0,8%, azul de
171 Comassie G-250 0,08% e metanol 20%) onde permaneceram corando por cinco dias.
172 Após esse procedimento, o corante foi retirado do recipiente e substituído por água
173 destilada, onde os géis foram mantidos sob suave agitação até a remoção do corante
174 impregnado nos géis. Para cada ponto de coleta foram preparados géis em triplicata.

175 **Aquisição e análise das imagens**

176 Os géis foram escaneados usando o ImageScanner II (Amersham) em 300 dpi, para
177 posterior análise das imagens no software ImageMaster 7.0 (GE Healthcare).
178 Em seguida, as imagens dos géis 2-DE foram analisadas e comparadas para a
179 identificação e quantificação relativa dos *spots*, usando o software ImageMaster 2D
180 Platinum em gráficos 3D, considerando área e intensidade dos *spots*. O teste de
181 ANOVA foi usado para demonstrar diferenças significativas entre a mudança de
182 intensidade dos *spots*.

183 **Tratamentos dos *spots* para espectrometria de massas**

184 Os *spots* considerados relevantes foram excisados do gel, lavados com tampão
185 bicarbonato de amônio 25 mmol L⁻¹ e acetonitrila e desidratados em 100 µL de
186 acetonitrila 100% por cinco minutos e secos a vácuo (*Concentrator 5301-Eppendorf*).
187 Após as lavagens, os *spots* foram digeridos com 0,0125 µg µL⁻¹ de tripsina em tampão
188 bicarbonato de amônio 25 mmol.L-1. Os peptídeos foram extraídos com 5% de TFA
189 (ácido trifluoroacético), 50% de acetonitrila e 45% de água a 37 °C. Em seguida, as
190 amostras foram concentradas a vácuo até atingirem um volume entre 10 e 15 µL.

191

Resultados e discussão

192 Uma análise comparativa de perfis proteicos de tecido foliar foi realizada em dois
193 genótipos de citros, um porta-enxerto ('Sunki Maravilha') e uma copa ('Valência'), em
194 folhas infestadas e não infestadas por *D. citri*, por meio de eletroforese bidimensional.
195 As análises comparativas dos perfis proteicos foram realizadas com o tratamento
196 controle e com plantas após cinco dias de infestação.

197 Os genótipos 'Sunki Maravilha' e 'Valência' exibiram perfis proteicos distintos,
198 mostrando intensidades diferenciais entre os tratamentos (Figuras 1 e 2). Os *spots* de
199 proteínas detectados em ambos os genótipos apresentaram massa molecular variando
200 entre 14 e 97 KDa. Além disso, foram observadas proteínas exclusivas em ambos os
201 genótipos, após cinco dias de infestação por *D. citri*.

202 Em 'Sunki Maravilha', 648 *spots* foram identificados, sendo 62 *spots* comuns aos
203 tratamentos, 249 *spots* exclusivos do tratamento com infestação pelo psilídeo (Figura
204 1B) e 337 *spots* foram exclusivos do controle (Figura 1A).

205 No genótipo 'Valência', um total de 543 *spots* foram detectados. Destes, 129 *spots*
206 foram comuns a ambos os tratamentos, 191 *spots* foram exclusivos do tratamento com a
207 infestação (Figura 2B) e 223 *spots* foram exclusivos da condição controle (Figura 2A).

208 Os *spots* que mostraram diferenças significativas na abundância ($p < 0,05$) foram
209 submetidos a tratamento enzimático para posterior análise por espectrometria de
210 massas.

211 Os resultados obtidos corroboram outros trabalhos realizados com análise proteômica de
212 plantas submetidas à infestação por insetos sugadores, como por exemplo, nos sistemas
213 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. sob infestação por *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo
214 B (Yin et al., 2012), *A. thaliana* sob infestação por *Myzus persicae* Sulzer (Truong et
215 al., 2015) e *Triticum monococcum* L sob infestação por *Sitobion avenae* (F.) (Guan et al.
216 (2015). Assim como discutido pelos autores previamente citados, as modificações no
217 perfil proteico observadas podem indicar ativação de mecanismos de defesa da planta
218 provocada pela alteração em seu metabolismo traduzida pela realocação dos recursos do
219 metabolismo primário para o secundário, quando as plantas estão expostas à infestação
220 por *D. citri*.

221 Obviamente, as diferenças na expressão de proteínas em genótipos porta-enxerto e copa
222 de citros, na ausência ou presença de *D. citri*, são justificadas pela variabilidade
223 genética na espécie. Entretanto, os resultados obtidos na condição sob infestação do
224 inseto são relevantes quando se considera o potencial de interferência dessas proteínas

225 no grau de suscetibilidade ao complexo inseto/planta/bactéria traduzida pela sua
226 possível função na indução de mecanismos de defesa (Das et al., 2013; Delory et al.,
227 2016; Kim et al., 2009; Witzany, 2006; Yan et al., 2013).

228 As respostas das plantas à infestação por *D. citri* foram observadas em um curto tempo
229 de exposição (cinco dias), corroborando trabalhos realizados com a mesma espécie
230 (Malik et al., 2013, cinco dias) e também para outras espécies sugadoras como por
231 exemplo para *M. persicae* (Truong et al., 2015, três dias) e *Sitobion avenae* (Guan et al.,
232 2015, 24 horas). Yin et al. (2012), por outro lado, observaram respostas após 21 dias de
233 infestação por *B. tabaci*. Interessantemente, no sistema investigado por Truong et al.
234 (2015), após 8 dias de infestação por *M. persicae*, as respostas foram diferenciadas no
235 genótipo resistente, o que pode indicar alterações na regulação transcricional induzidas
236 pela resposta tardia ao inseto. Esses autores também observaram diferenças no tipo de
237 resposta induzida no genótipo resistente (local ou sistêmica), de acordo com o tempo de
238 exposição ao inseto. Assim, o conhecimento das proteínas associadas à defesa contra
239 ataque de *D. citri* pode ser útil em programas de melhoramento da cultura dos citros.
240 Adicionalmente, Vyas et al. (2015) comprovaram que a bactéria causadora do HLB
241 interage de maneira diferenciada com adultos e ninfas de *D. citri* em relação ao seu
242 metabolismo, desenvolvimento e imunidade. Considerando que a bactéria inicialmente
243 danifica o sistema radicular das plantas antes dos sintomas serem visíveis na parte aérea
244 (Johnson et al., 2014), é possível que proteínas de defesa contra a infecção pela bactéria
245 no sistema radicular sejam ativadas ou induzidas por sinais elicitados pela presença do
246 vetor na parte aérea.

247 Os dados demonstram que podem estar ocorrendo alterações proteicas nos genótipos
248 estudados, em resposta à infestação por *D. citri*. Análises adicionais, como a
249 espectrometria de massa, são necessárias para identificação dessas proteínas e melhor
250 compreensão das respostas da planta ao inseto.

251 A importância de se conhecer a resposta proteica é utilizar as informações genéticas
252 para que futuramente possam ser criados genótipos resistentes ao ataque do psilídeo e
253 posteriormente fomentar estratégias para controle da doença.

254

255

Agradecimentos

256 À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa de estudos
257 concedida ao primeiro autor.

258

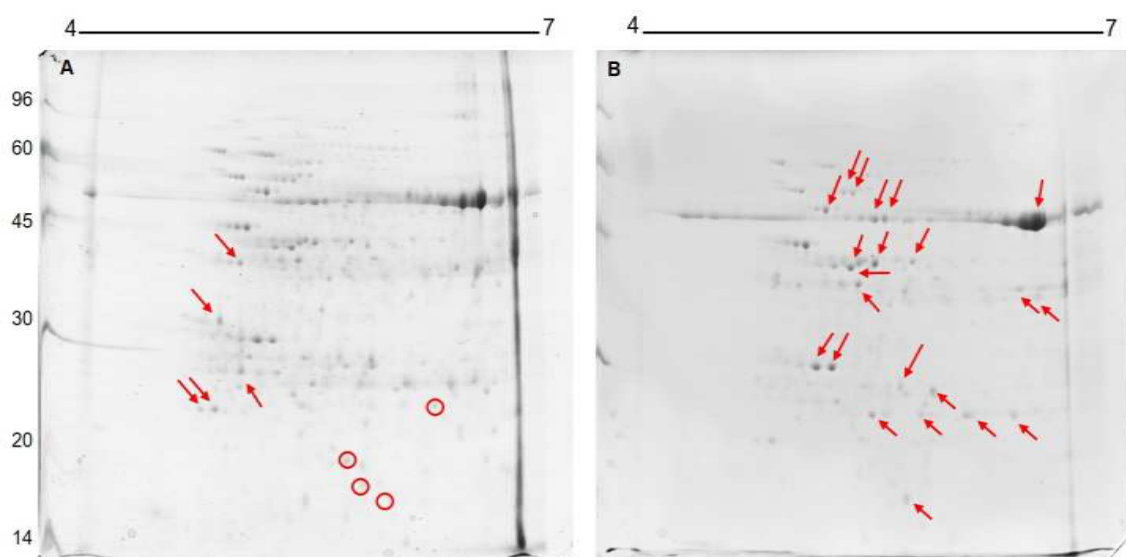
Referências

- 259
260 Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease
261 of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37.
- 262 Bassanezi, R. B.; Lopes, S. A.; Belasque, Jr. J. B.; Spósito, M. B.; Yamamoto, P. T.;
263 Miranda, M. P.; Teixeira, D. C.; Wulff, N. A. Epidemiologia do Huanglongbing e suas
264 implicações para o manejo da doença. *Citrus Research & Technology, Cordeirópolis*,
265 v.31, n.1, p 11-23, 2010 a.
- 266 Das, A.; Lee, S.H.; Hyun, T.K.; Kim, S.W.; Kim, J.Y. 2013. Plant volatiles as method
267 of communication. *Plant Biotechnology Reports* 7: 9-26.
- 268 Delory, B.M.; Delaplace, P.; Fauconnier, M.L.; Du Jardin, P. 2016. Root-emitted
269 volatile organic compounds: can they mediate belowground plant-plant interactions?
270 *Plant and Soil* 402: 1-26.
- 271 Grafton-Cardwell, E.E.; Stelinski, L.L.; Stansly, P.A. 2013. Biology and management
272 of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Annual Review of*
273 *Entomology* 58: 413-432.
- 274 Guan, W.; Ferry, N.; Edwards, M.G.; Bell, H.A.; Othman, H.; Gatehouse, J.A.;
275 Gatehouse, A.M. 2015. Proteomic analysis shows that stress response proteins are
276 significantly up-regulated in resistant diploid wheat (*Triticum monococcum*) in response
277 to attack by the grain aphid (*Sitobion avenae*). *Molecular Breeding* 35: 1-22.
- 278 Johnson, E.G.; Wu, J.; Bright, D.B.; Graham, J.H. 2014. Association of '*Candidatus*
279 *Liberibacter asiaticus*' root infection, but not phloem plugging with root loss on
280 huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathology*
281 63: 290-298.
- 282 Kim, J.; Sagaram, U.; Burns, J.; LI, J.; Wang, N. 2009. Response of sweet orange
283 (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: microscopy and
284 microarray analyses. *Phytopathology* 99: 50-57.
- 285 Mafra, V.; Martins, P.K.; Francisco, C.S.; Alves, M.R.; Freitas-Astúa, J.; Machado,
286 M.A. 2013. *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of
287 the transcriptome of the susceptible citrus genotype. *BMC genomics* 14: 1.

- 288 Malik, N.S.A.; Perez, J.L.; Kunta, M.; Patt, J.M.; Mangan, R.L. 2013. Changes in free
289 amino acids and polyamine levels in Satsuma leaves in response to Asian citrus psyllid
290 infestation and water stress. *Insect Science* 21: 707-716.
- 291 Manjunath, K.L.; Halbert, S.E.; Ramadugu, C.; Webb, S.; Lee, R.F. 2008. Detection of
292 *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Diaphorina citri* and its importance in the
293 management of citrus Huanglongbing in Florida. *Phytopathology* 98: 387-396.
- 294 Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D.; Ehrhardt, W. 1988. Improved staining of proteins in
295 polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at
296 nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*
297 9: 255-262.
- 298 Nwugo, C.C.; Lin, H.; Duan, Y.; Civerolo, E.L. 2013. The effect of '*Candidatus*
299 *Liberibacter asiaticus*' infection on the proteomic profiles and nutritional status of pre-
300 symptomatic and symptomatic grapefruit (*Citrus paradisi*) plants. *BMC Plant Biology*
301 13: 1.
- 302 Pirovani, C.P.; Carvalho, H.A.S.; Machado, R.C.R.; Gomes, D.S.; Alvim, F.C.;
303 Pomella, A.W.V.; Gramacho, K.P.; Cascardo, J.C. de M.; Amarante, G.; Pereira, G.;
304 Micheli, F. 2008. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and
305 meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the
306 witches' broom disease. *Electrophoresis* 29: 2391-2401.
- 307 Ranulfi, A.C.; Cardinali, M.C B.; Kubota, T.M.K.; Freitas-Astúa, J.; Ferreira, E.J.;
308 Belleto, B.S.; Silva, M.F.G. da; Villas Boas, P.R.; Magalhães, A.B.; Milori, D.M.B.P.
309 2016. Laser-induced fluorescence spectroscopy applied to early diagnosis of citrus
310 Huanglongbing. *Biosystems Engineering* 144: 133-144.
- 311 Truong, D.H.; Bauwens, J.; Delaplace, P.; Mazzucchelli, G.; Lognay, G.; Francis, F.
312 2015. Proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh responses to a generalist
313 sucking pest (*Myzus persicae* Sulzer). *Plant Biology* 17: 1210-1217.
- 314 Vyas, M.; Fisher, T.W.; He, R.; Nelson, W.; Yin, G.; Cicero, J.M.; Willer, M.; Kim, R.;
315 Kramer, R.; May, G.A.; Crow, J.A.; Soderlund, C.A.; Gang, D.R.; Brown, J.K. 2015.
316 Asian citrus psyllid expression profiles suggest *Candidatus Liberibacter asiaticus*-

- 317 mediated alteration of adult nutrition and metabolism, and of nymphal development and
318 immunity. PloS One 10: 1-31.
- 319 Yan, Q.; Sreedharan, A.; Wei, S.; Wang, J.; Pelz-Stelinski, K.; Folimonova, S.; Wang,
320 N. 2013. Global gene expression changes in *Candidatus Liberibacter asiaticus* during
321 the transmission in distinct hosts between plant and insect. Molecular Plant Pathology
322 14: 391-404.
- 323 Yin, H.; Yan, F.; Ji, J.; Li, Y.; Wang, R.; Xu, C. 2012. Proteomic analysis of
324 *Arabidopsis thaliana* leaves infested by tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) B
325 biotype. Plant Molecular Biology Reporter 30: 379-390.
- 326 Witzany, G. 2006. Plant communication from biosemiotic perspective: differences in
327 abiotic and biotic signal perception determine content arrangement of response
328 behavior. Context determines meaning of meta-, inter-and intraorganismic plant
329 signaling. Plant Signaling & Behavior 1: 169-178.

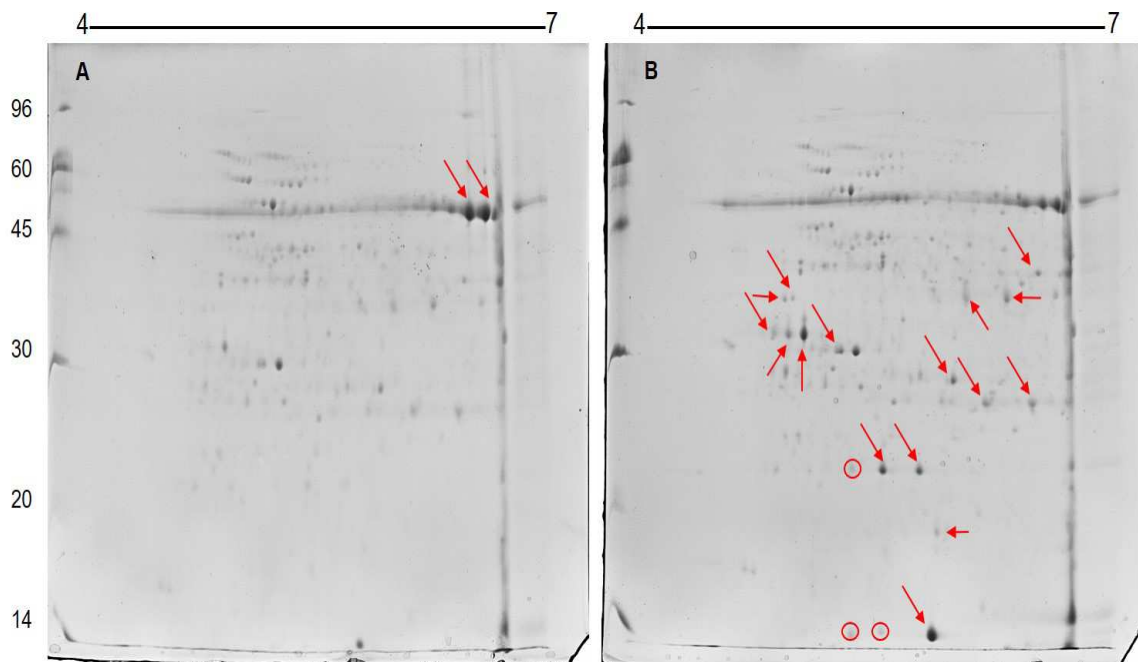
330



331

332 **Figura 1** - Gel 2D de proteínas de tecido foliar em 'Sunki Maravilha' sob condição
333 controle (A) e infestada com *Diaphorina citri* (B). As proteínas indicadas por setas
334 tiveram sua abundância diferencialmente alterada pela infestação do inseto. As
335 proteínas indicadas por círculos são exclusivas do tratamento.

336



337

338 **Figura 2** - Gel 2D de proteínas de tecido foliar em 'Valência' sob condição controle
339 (A) e infestada com *Diaphorina citri* (B). As proteínas indicadas por setas tiveram sua
340 abundância diferencialmente alterada pela infestação do inseto. As proteínas indicadas
341 por círculos são exclusivas do tratamento.

342

ARTIGO 2

**ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO PESQUISA AGROPECUÁRIA
BRASILEIRA**

1 **Respostas fisiológicas de plantas cítricas à infestação por *Diaphorina citri* sob**
2 **estresse hídrico**

3 Samille Andrade Aguiar⁽¹⁾, Florisvaldo Pereira Mascarenhas Junior⁽¹⁾, Mauricio Antonio
4 Coelho Filho⁽²⁾ e Marilene Fancelli⁽²⁾

5

6 ⁽¹⁾Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus Cruz das Almas, Caixa Postal
7 007, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mail:

8 samilleaguiar26@hotmail.com, ⁽²⁾Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa, s/nº,
9 Caixa Postal 007, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mail:

10 marilene.fancelli@embrapa.br; mauricio-antonio.coelho@embrapa.br.

11 Resumo - O *Huanglongbing* (HLB), doença que tem como vetor o inseto *Diaphorina*
12 *citri* Kuwayama é a principal ameaça fitossanitária ao agronegócio citros. Considerando
13 que a ocorrência do inseto é favorecida por fluxos de brotação, características
14 fisiológicas da planta, como tolerância ao estresse hídrico podem ser úteis no manejo da
15 praga. O presente trabalho objetivou determinar respostas fisiológicas de plantas de
16 citros à infestação por *D. citri* sob diferentes níveis de umidade do solo. O experimento
17 foi conduzido em condições de telado, avaliando-se os genótipos 'Valência' e 'Sunki
18 Maravilha'. O delineamento foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial com quatro
19 repetições. Adultos do psilídeo foram confinados em uma gaiola de *voil* por folha
20 durante cinco dias. Os parâmetros fisiológicos foram avaliadas na planta por meio de
21 analisador de gás a infravermelho (IRGA). A transpiração foi superior em plantas não
22 estressadas em relação àquelas sob estresse hídrico. Para a condutância estomática e
23 fotossíntese, verificou-se interação significativa entre nível de estresse e nível de
24 infestação. Conclui-se que a infestação por *D. citri* reduz a condutância estomática de
25 plantas sob estresse hídrico.

26 Termos para indexação: Liviidae, psilídeo, estresse biótico, estresse abiótico, IRGA.

27 **Physiological responses of citric plants to *Diaphorina citri* infestation under hydric**
28 **stress**

29

30 Abstract - The *Huanglongbing* (HLB), a disease vectored by the insect *Diaphorina citri*
31 Kuwayama is the main phytosanitary threat to citrus agribusiness. Whereas the insect
32 occurrence is favored by budding flows, physiological characteristics of the plant, such
33 as tolerance to drought stress may be useful in the management of the pest. This work
34 aimed to determine physiological responses of citrus plants to the infestation by *D. citri*

1 under different humidity levels of soil. An experiment was carried out under greenhouse
2 conditions, evaluating the genotypes 'Valencia' and 'Sunki Maravilha'. The design was
3 completely randomized in a factorial arrangement with four replicates. Psyllid adults
4 were confined in a voile cage per leaf during 5 days. Physiological parameters were
5 evaluated by using an infrared gas analyzer (IRGA). The transpiration was higher in
6 non-stressed plants compared to those submitted to hydric stress. As for the stomatal
7 conductance and photosynthesis, it was observed a significant interaction between stress
8 level and infestation level. It is concluded that *D. citri* infestation reduces the stomatal
9 conductance in plants under hydric stress.

10 Index terms: Liviidae, Asian citrus psyllid, biotic stress, abiotic stress, IRGA.

12 **Introdução**

13 O *Huanglongbing* (HLB) constitui-se na ameaça mais evidente e devastadora da
14 citricultura mundial (Bassanezi et al., 2011). Os agentes causais no Brasil são as
15 bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus*
16 (Fundecitrus, 2014). Essa doença tem como vetor duas espécies de insetos, *Trioxa*
17 *erytrae* Del Guercio (Hemiptera: Trioxidae) e *Diaphorina citri* Kuwayama
18 (Hemiptera: Liviidae). No Brasil, *D. citri*, conhecido como psilídeo dos citros, é o vetor
19 do HLB (Halbert et al., 2004).

20 Os sintomas mais característicos dessa doença são manchas com coloração
21 amarelo pálido sem uniformidade, aparecimento de frutos pequenos, assimétricos e de
22 sabor ácido, os quais não são comercializáveis, além de ramos com folhas mosqueadas
23 ou cloróticas, queda de folhas e seca dos ponteiros, podendo eventualmente levar as
24 plantas à morte (Bové, 2006; Stokstad, 2006). Ressalta-se, ainda que a maturação inicia-
25 se pela região do pedúnculo, ao contrário da normal, que se inicia pela região estilar
26 (Yamamoto et al., 2001).

27 O psilídeo se alimenta nas folhas e ramos verdes das brotações. Assim, fatores
28 abióticos como estresse hídrico podem afetar a atratividade do inseto para a planta. O
29 déficit hídrico é considerado o fator mais limitante ao crescimento e ao
30 desenvolvimento das plantas, ocorrendo em grande extensão de área cultivada com
31 citros, sobretudo em regiões áridas e semiáridas, as quais se caracterizam pela baixa
32 precipitação pluviométrica e pela irregularidade na distribuição das chuvas (Suassuna et
33 al., 2012). Taxa de fotossíntese, condutância estomática e transpiração são algumas das
34 variáveis que podem ser afetadas pela deficiência hídrica (Sampaio, 2014).

1 Segundo Nogueira et al. (2001), genótipos de citros que apresentem resistência à
2 deficiência hídrica se constituem em excelentes materiais para serem utilizados como
3 porta-enxerto. Entre os principais porta-enxertos cítricos comerciais, destaca-se a
4 tangerina ‘Sunki Maravilha’ (*Citrus sunkii* ex Tan.). Apesar de sensível à escassez de
5 água, é indicada em combinações com copas de laranja doce, conferindo às mesmas
6 elevado vigor e produtividade (Azevêdo, 2013). Por outro lado, dentre as cultivares
7 copa utilizadas na citricultura nacional, a laranja ‘Valência’ (*Citrus sinensis* (L.)
8 Osbeck) destaca-se na produção e comercialização de suco, sendo também bastante
9 consumida *in natura* (Blumer et al., 2006).

10 Embora os sintomas do HLB sejam principalmente visualizados na parte aérea, o
11 sistema radicular, e conseqüentemente, o porta-enxerto, apresenta importante papel na
12 disseminação da bactéria pela planta, conforme modelo apresentando por Johnson et al.
13 (2014), justificando-se, assim, a realização de estudos sobre a interação entre fatores
14 bióticos e abióticos (Malik et al., 2013). Entretanto, a maior parte dos trabalhos versa
15 sobre o efeito da infestação de artrópodes sobre parâmetros fisiológicos das plantas
16 (Retuerto et al., 2004; Lemos Filho et al., 2007; Bueno et al., 2009, entre outros).

17 O presente trabalho objetivou determinar respostas fisiológicas de plantas de dois
18 genótipos de citros à infestação por *D. citri* sob diferentes níveis de umidade do solo.

19

20

Material e métodos

21

O experimento foi conduzido em telado, sob temperatura média de 24,7 °C, sendo
22 a média máxima de 28,7 °C, a média mínima de 20,1 °C e amplitude térmica de 8,6 °C.

23

24

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo
25 fatorial (2 x 2 x 2 x 2) com 2 genótipos, 2 níveis de umidade do solo, 2 níveis de
26 infestação dos insetos (com e sem adultos de *D. citri*) e 2 períodos de avaliação (início e
27 final da infestação), com quatro repetições. Os genótipos avaliados foram laranja
‘Valência’ e tangerina ‘Sunki Maravilha’.

28

Produção de mudas de citros

29

30

Utilizaram-se os genótipos de laranja ‘Valência’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e
30 tangerina ‘Sunki Maravilha’ (*Citrus sunkii* ex Tan). Sementes foram coletadas e

31

dispostas em bandejas para semeadura onde permaneceram por 60 dias, procedendo-se a
32 irrigação e os tratos culturais normais para a cultura. Após esse período, foi realizada a

33

eliminação de híbridos e o transplântio para sacos plásticos com volume de 5 L,

1 preenchido com substrato composto por 2 partes de solo de barranco, 2 partes de
2 Rendmax® e 1 parte de areia lavada.

3 **Criação de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)**

4 Adultos de *D. citri* foram coletados utilizando-se um mini-aspirador em brotações
5 de murta (*Murraya paniculata*) e transferidos para gaiolas com laterais de tela anti-
6 afídica e mangas de tecido para manipulação dos insetos conforme metodologia
7 adaptada de Skelley & Hoy (2004). Plantas de murta mantidas em tubetes ou sacos
8 plásticos e contendo brotações e folhas novas consistiram no substrato de alimentação e
9 oviposição para os insetos mantidos na criação. Visando fornecer plantas com condições
10 adequadas para o inseto, periodicamente ocorreu a sementeira, poda e adubação das
11 plantas. Plantas de murta foram usadas na criação de *D. citri* por se constituírem no
12 hospedeiro preferencial do inseto (Ikeda & Ashihara, 2008).

13 **Monitoramento da água no solo**

14 Os níveis de umidade do solo avaliados foram umidade na capacidade de campo
15 (controle) e a 20% da capacidade de campo (sob déficit), aplicados em plantas jovens de
16 genótipos de citros (após o transplantio) com base na análise físico-hídrica do solo.

17 Para aferição do nível de umidade do solo, uma sonda de TDR (*Time Domain*
18 *Reflectrometry*), foi inserida no substrato do recipiente contendo cada muda, mantendo
19 profundidade fixa em relação à superfície do solo.

20 No tratamento controle, o teor de umidade foi mantido na capacidade de campo
21 (umidade superior a $0,20 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$) mediante reposição de água absorvida pela planta no
22 período de secamento do solo. Para o tratamento sob estresse hídrico, o critério para
23 reposição de água considerou o nível de umidade do solo igual ou inferior a $0,15 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$.
24

25 **Parâmetros fisiológicos avaliados**

26 Realizou-se a avaliação de variáveis de crescimento no período inicial do
27 experimento, mediante medição da altura das plantas e medição da largura e
28 comprimento das folhas, para determinar a área foliar. A área foliar foi estimada
29 conforme Coelho Filho et al. (2005).

30 Avaliaram-se as relações hídricas (taxa de transpiração, fotossíntese, condutância
31 estomática) dos genótipos em cada tratamento aplicado no início e no final da
32 infestação. Para essa finalidade, utilizou-se o aparelho IRGA (analisador de gás a
33 infravermelho).

34

1 **Infestação com adultos de *D. citri***

2 A infestação por *D. citri* foi realizada mediante confinamento dos insetos em
3 gaiolas confeccionadas em tecido *voil* com aberturas fechadas por velcro. Quinze
4 adultos de *D. citri* foram confinados em uma folha de citros durante cinco dias (Malik et
5 al., 2013). Foram utilizadas duas gaiolas por planta. As folhas selecionadas para a
6 infestação foram aquelas completamente desenvolvidas a partir do ápice. Os adultos
7 foram coletados da criação mantida em laboratório. Os insetos, sem distinção de sexo e
8 idade, foram aspirados e mantidos em pipeta de Pasteur até liberação nas gaiolas de *voil*.
9 Para fixação das gaiolas à planta, foram utilizados prendedores e espuma para vedar a
10 abertura das mesmas. As variáveis observadas, relacionadas ao inseto, foram número de
11 adultos vivos e mortos.

12 **Análise estatística**

13 As variáveis analisadas foram submetidas à análise de variância e as médias
14 comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o programa estatístico Sisvar
15 (Ferreira, 2010).

16

17

Resultados e discussão

18 Não foi verificada interação significativa entre os genótipos e tratamentos para as
19 variáveis de crescimento das plantas no início do experimento. As plantas encontravam-
20 se com tamanho e área foliar similares nos diferentes genótipos e tratamentos (dados
21 não apresentados).

22 O monitoramento periódico do nível de umidade do solo pelo uso da TDR
23 propiciou, em ambas as condições, para os dois genótipos, o acompanhamento da
24 necessidade de irrigação e reposição de água para atingir o nível de umidade planejado
25 para o trabalho (Figura 1). Observou-se comportamento similar entre os genótipos em
26 relação à extração de água, considerando plantas estressadas ou não estressadas até 60
27 dias após o início das avaliações. Em média, plantas de 'Valência' e 'Sunki Maravilha'
28 demoraram, respectivamente, 75 dias e 60 dias para atingirem 20% da capacidade de
29 campo. Essas diferenças são observadas em estudos de extração de água no solo em
30 plantas cítricas (Neves et al., 2013; Sampaio, 2014), e refletem as diferenças genotípicas
31 relacionadas à exploração do solo (densidade de comprimento radicular) e/ ou
32 condutividade hidráulica do sistema radicular e trocas gasosas. Verifica-se que houve a
33 manutenção da umidade em níveis ótimos estabelecidos, visando à adequação das
34 plantas para o experimento, quando ocorreu a infestação, considerando o nível de

1 umidade superior a $0,20 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ para plantas na condição controle (sem estresse) e de
2 $0,15 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ para plantas estressadas.

3 Considerando a variável taxa de transpiração, a interação entre os fatores
4 avaliados não foi significativa. O efeito dos tratamentos (presença e ausência de estresse
5 hídrico) foi significativo ($gl=1$, $p < 0,01$). As plantas submetidas ao estresse hídrico
6 apresentaram valor de transpiração ($0,769 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) inferior aos das plantas não
7 submetidas ao estresse hídrico ($1,233 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (Figura 2A).

8 Esse efeito de redução da transpiração em plantas sob estresse hídrico é bem
9 documentado na literatura (Medina et al., 1999; Magalhães Filho et al., 2008; Neves et
10 al., 2013; Sampaio, 2014), como um mecanismo para evitar a perda de água celular em
11 resposta à possível sinalização hidráulica radicular de ácido abscísico (ABA).

12 O período de avaliação da taxa de transpiração também influenciou negativamente
13 esta variável ($gl=1$, $p < 0,01$), pois ao final da infestação por *D. citri* (5 dias), a taxa de
14 transpiração foi reduzida ($0,845 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) em relação à avaliação no início da
15 infestação ($1,189 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (Figura 2B).

16 Neves et al. (2006) também verificaram redução na transpiração de folhas de
17 *Citrus limonia* (Osbeck) infestadas por *Orthezia praelonga* Douglas, 1891 nos níveis
18 intermediários de infestação (7% a 13% e de 14% a 40%). Contudo, sob alta infestação
19 (>40%), verificou-se aumento da transpiração, não diferindo do tratamento sob baixa
20 infestação (0% a 6%).

21 Já com relação ao efeito dos genótipos, não houve diferença significativa para a
22 variável taxa de transpiração entre ‘Valência’ e ‘Sunki Maravilha’, assim como para
23 nível de infestação (dados não apresentados).

24 Em relação à condutância estomática, verificou-se interação significativa apenas
25 entre tratamento e nível de infestação ($gl=1$, $p < 0,01$). Para plantas não estressadas, a
26 infestação por *D. citri* aumentou a condutância estomática, sendo o valor ($0,055 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
27 significativamente superior àquele verificado para plantas não infestadas ($0,042$
28 $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (Figura 3A). Já para plantas submetidas ao estresse hídrico, não se verificou
29 o mesmo comportamento. A infestação por adultos de *D. citri* reduziu a condutância
30 estomática das plantas estressadas ($0,014 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) em comparação com aquelas não
31 infestadas ($0,034 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (Figura 3B).

32 Aumento da condutância estomática em plantas não estressadas por água
33 também foi observado para altos níveis de infestação de *O. praelonga* em *C. limonia*
34 (Neves et al., 2006). Os resultados não concordam com Lemos Filho et al. (2007), na

1 condição sem estresse, que registraram redução da condutância estomática em folhas
2 com galhas induzidas por *Pseudophacopteron* sp. e uma espécie cecidomiídea em
3 relação àquelas sadias para *Aspidosperma australe* Müell. Arg. e de *A. spruceanum*
4 Benth. ex Müell. Arg. A intensidade da infestação pode influenciar na fotossíntese e
5 consequentemente o fechamento dos estômatos.

6 Não houve efeito significativo dos fatores genótipo, nível de infestação e período
7 de avaliação para condutância estomática (dados não apresentados).

8 Para fotossíntese, verificou-se efeito significativo da interação entre tratamento e
9 nível de infestação ($gl=1$, $p < 0,01$). Na condição de plantas não estressadas, a infestação
10 por adultos de *D. citri* aumentou a taxa de fotossíntese (valor de $5,215 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) em
11 relação às plantas não infestadas ($3,867 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Figura 4A). Contudo, em plantas
12 submetidas ao estresse hídrico, embora não tenha sido constatado efeito significativo da
13 infestação sobre a fotossíntese, essa resposta foi inversa (Figura 4B).

14 Considerando plantas estressadas, há uma tendência de redução da taxa de
15 fotossíntese em relação às plantas controle (Figura 4), estando os resultados de acordo
16 com Tippmann et al. (2006). Corroborando esses autores, na condição de estresse
17 hídrico, o metabolismo celular e o mecanismo de manutenção da pressão de turgor são
18 afetados, comprometendo, assim, os processos de expansão celular. Dessa forma, as
19 plantas, no intuito de minimizar a perda de água, fecham os estômatos, o que reduz o
20 suprimento de CO_2 nas folhas, afetando diretamente a taxa fotossintética.

21 O aumento na taxa fotossintética de plantas infestadas por *D. citri* em plantas
22 controle corrobora resultados observados por Retuerto et al. (2004) para infestação de
23 *Coccus* sp. em plantas de *Ilex aquifolium* L. À semelhança dos resultados obtidos neste
24 trabalho, os autores anteriormente citados observaram aumento da fotossíntese inclusive
25 em folhas de plantas infestadas nas quais o inseto não estava presente.

26 Entretanto, os resultados obtidos diferem daqueles apresentados por Bueno et al.
27 (2009), que verificaram redução da fotossíntese em plantas de soja infestadas pelo ácaro
28 *Tetranychus urticae* Koch, atribuindo-se esse efeito ao decréscimo da condutância
29 estomática. Os autores associaram o fechamento dos estômatos à resposta da planta
30 induzida pela infestação do ácaro.

31 Dessa forma, as variáveis fisiológicas podem ser consideradas como importantes
32 para determinação do nível de controle de pragas, a exemplo do que afirmaram Neves et
33 al. (2006), para os quais a taxa de fotossíntese foi a variável fisiológica mais adequada
34 para avaliar os efeitos dos danos causados por *O. praelonga*.

1 Possivelmente, as respostas diferenciais das plantas à infestação dependem do
2 hábito alimentar dos artrópodes envolvidos e do sistema avaliado. Ou seja, para espécies
3 como os ácaros, que levam à destruição parcial do conteúdo celular, a planta tenta
4 equilibrar a alteração no turgor fechando os estômatos e reduzindo a fotossíntese. Já
5 para insetos altamente especializados na sucção de seiva do floema, como *D. citri*, como
6 não ocorre destruição celular, a resposta parece estar associada ao mecanismo proposto
7 por Retuerto et al. (2004), no qual a planta tenta compensar a perda de seiva
8 aumentando a taxa fotossintética (efeito no balanço entre fonte e dreno) provocado pelo
9 aumento da demanda de carbono em plantas infestadas.

10 Já, no caso de plantas estressadas, o estresse biótico parece ter intensificado o
11 efeito do estresse abiótico, reduzindo a taxa fotossintética nas plantas em relação
12 àquelas não infestadas, corroborando Aldea et al. (2005) e Dobbertin et al. (2007).

13 O efeito do genótipo, do nível de infestação e do período de avaliação não foi
14 significativo (dados não apresentados).

15 Com referência aos adultos de *D. citri* confinados em gaiolas de *voil*, não houve
16 diferença estatística para número de insetos vivos, sendo a mortalidade também não
17 afetada pelos tratamentos avaliados (Tabela 1). Entretanto, deve-se considerar que o
18 tempo de confinamento dos insetos na gaiola pode não ter sido suficiente para que a
19 exposição a alimentos de diferentes qualidades nutricionais provocasse efeitos severos
20 sobre a sobrevivência do inseto. Desse modo, considera-se que os resultados obtidos no
21 trabalho tenham sido resultantes da interação entre os fatores abióticos e bióticos.

22 No presente trabalho, verificou-se interação entre estresse de natureza biótica
23 (infestação por *D. citri*) e abiótica (estresse hídrico). Muitas vezes, as respostas
24 fisiológicas a esses fatores não são exclusivas, conforme advertiram Mazid et al. (2011),
25 sendo difícil atribuir a origem dessas alterações fisiológicas a um determinado nível de
26 estresse, visto que as plantas podem estar sujeitas a um complexo de fatores
27 estressantes.

28 Mecanismos de defesa contra artrópodes envolvem a produção de substâncias
29 químicas, como os terpenos, entre eles triterpenos (limonoides) presentes em citros
30 (Mazid et al., 2011). Embora a acumulação de compostos de defesa seja interessante
31 para a proteção das plantas contra o ataque de herbívoros, a síntese desses compostos
32 implica em desvio da energia que seria utilizada para o crescimento e reprodução
33 (Harborne, 1993).

1 Adicionalmente, Dobbertin et al. (2007) verificaram redução na expressão de
2 defesas em plantas de pinheiro com aumento da suscetibilidade a coleópteros-praga em
3 consequência de severo estresse hídrico.

4 Por outro lado, o mesmo grupo de compostos químicos (terpenos) também pode
5 estar envolvido na regulação de mecanismos da planta em resposta ao estresse hídrico,
6 como o ABA. Tippmann et al. (2006) reportaram, em plantas sob estresse hídrico, a
7 produção de ABA pelas raízes e subsequente translocação para as folhas via floema. Em
8 resposta à acumulação de ABA nas folhas, os estômatos se fecham, provocando redução
9 do metabolismo vegetal e fotossíntese. Analogamente, para a bactéria causadora do
10 HLB, no modelo proposto por Johnson et al. (2014), a bactéria, uma vez inoculada pelo
11 vetor, move-se para o sistema radicular, onde se multiplica nos vasos do floema e, nos
12 períodos de fluxo vegetativo, desloca-se para as brotações. Assim, verifica-se a
13 necessidade de maiores estudos sobre as interações entre estresse biótico e abiótico para
14 o sistema HLB - *D. citri* - citros.

16 Conclusões

- 17 1. O estresse biótico, provocado pela infestação por *Diaphorina citri*, altera as
18 respostas fisiológicas das plantas assim como o estresse hídrico pode interferir na
19 magnitude das respostas fisiológicas induzidas pelo inseto.
- 20 2. A infestação por *D. citri* reduz a condutância estomática de plantas sob estresse
21 hídrico.

22 Agradecimentos

23 À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela
24 concessão de bolsa de estudos aos dois primeiros autores.

26 Referências

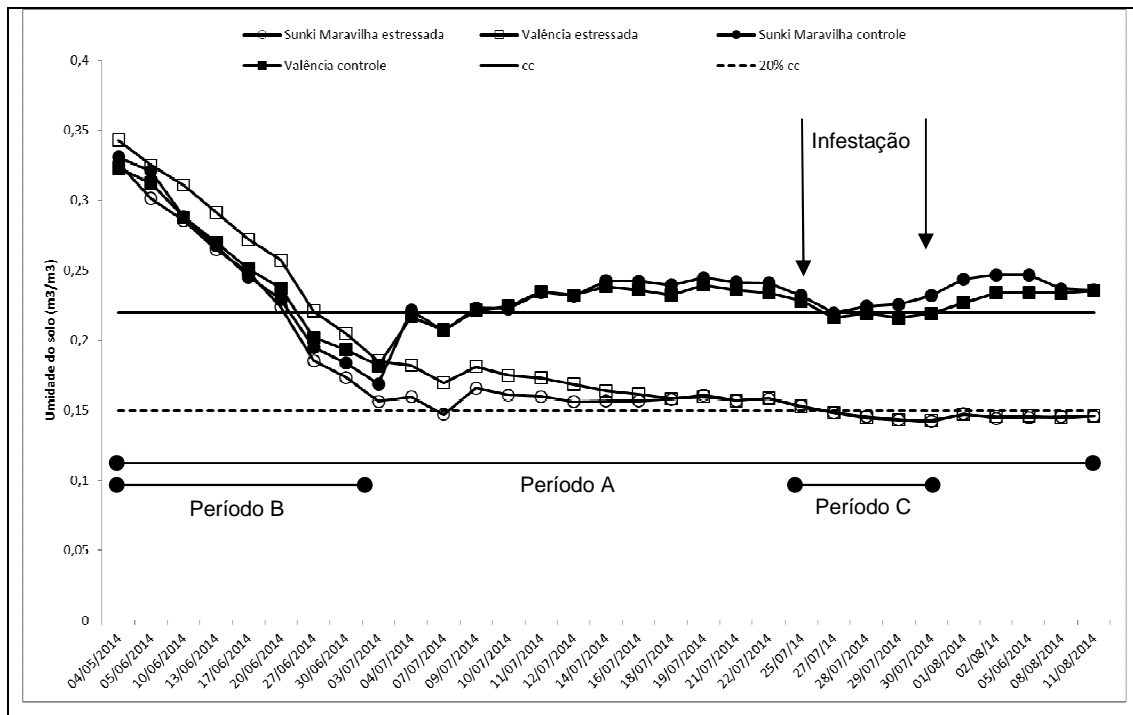
- 27 ALDEA, M.; HAMILTON, J.G., RESTI, J.P., ZANGERL, A.R., BERENBAUM, M.R.;
28 DELUCIA, E.H. Indirect effects of herbivory on leaf gas exchange in soybean. **Plant,**
29 **Cell and Environment**, v.28, p.402-411, 2005.
- 30 AZEVÊDO, C.L.L. Sistema de Produção de Citros para o Nordeste. 2013. Embrapa.
31 Disponível em:
32 <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/Citros>
33 Nordeste/importancia.htm>. Acesso em: 14 mai. 2016.

- 1 BASSANEZI, R.B.; LOPES, A.S.; BELASQUE JUNIOR, J.; SPÓSITO, M.B.;
- 2 YAMAMOTO, P.T.; MIRANDA, M.P.; TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A.
- 3 Epidemiologia do Huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus**
- 4 **Research & Technology**, v. 31, p. 11-24, 2011.
- 5 BLUMER, S.; POMPEU JUNIOR, J.; GARCIA, V. X. P. Características de qualidade
- 6 oferecidas por variedades de laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck.) com baixa acidez. In:
- 7 Congresso Brasileiro de Fruticultura. **Anais...** 16, Belém, 2006. CD-ROM.
- 8 BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a destructive newly emerging, century-old disease of
- 9 citrus. **Journal of Plant Pathology**, v.88, p.7-37, 2006.
- 10 BUENO, A. de F., BUENO, R.C.O. de F; NABITY, P.D. Photosynthetic response of
- 11 soybean to twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) injury. **Brazilian Archives**
- 12 **of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p.825-834, 2009.
- 13 COELHO FILHO, M.A., ANGELOCCI, L.R., VASCONCELOS, M.R.B.; COELHO,
- 14 E.F. Estimativa da área foliar de plantas de lima ácida 'Tahiti' usando métodos não-
- 15 destrutivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p.163-167, 2005.
- 16 DOBBERTIN, M.; WERMELINGER, B.; BIGLER, C.; BÜRGI, M.; CARRON, M.;
- 17 FORSTER, B.; GIMMI, U.; RIGLING, A. Linking increasing drought stress to scots
- 18 pine mortality and bark beetle infestations. **The Scientific World Journal**, v.7, p. 231-
- 19 239, 2007.
- 20 FERREIRA, D.F. **SISVAR** - Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras- MG:
- 21 UFLA, 2010.
- 22 FUNDECITRUS. Doenças e pragas. 2014. Disponível em:
- 23 <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/diaphorina-citri/24>>. Acesso em: 18 mai.
- 24 2016.
- 25 HALBERT, S. E. H & MANJUNATH, K. L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha:
- 26 Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in
- 27 Florida. **Florida Entomologist**, v. 3, n. 87, p.330-353, 2004.
- 28 HARBORNE, J.B. **Introduction to Ecological Biochemistry**. Academic Press,
- 29 London. 1993.
- 30 IKEDA, K.; ASHIHARA, W. Preference of adult asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*
- 31 (Homoptera: Psyllidae) for *Murraya paniculata* and *Citrus unshiu*. **Japanese Journal**
- 32 **of Applied Entomology and Zoology**, v. 52, p. 27-30, 2008.
- 33 JOHNSON, E. G.; WU, J.; BRIGHT D.B.; GRAHAM, J.H. Association of 'Candidatus
- 34 *Liberibacter asiaticus*' root infection, but not phloem plugging with root loss on

- 1 Huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. **Plant Pathology**,
2 v.63, p.290-298, 2014.
- 3 LEMOS-FILHO, J.P., CHRISTIANO, J.C.S. & E ISAIAS, R.M.S. Efeitos da infestação
4 de insetos galhadores na condutância e taxa relativa de transporte de elétrons em folhas
5 de *Aspidosperma australe* Müell. Arg. e de *A. spruceanum* Benth. ex Müell. **Revista**
6 **Brasileira de Biociências**, v.5, p.1152-1154, 2007.
- 7 MAGALHÃES FILHO, J.R., AMARAL, L. R & MACHADO, D. F. Deficiência
8 hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranjeira ‘Valência’ sobre dois tipos
9 de Porta Enxerto. **Bragantia**, v. 67, n. 1, p. 75-82, 2008.
- 10 MALIK, N.S.A.; PEREZ, J.L.; KUNTA, M.; PATT, J.M.; MANGAN, R.L. Changes in
11 free amino acids and polyamine levels in Satsuma leaves in response to Asian citrus
12 psyllid infestation and water stress. **Insect Science**, p. 1-10, 2013.
- 13 MAZID M., KHAN T.A.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense
14 mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, v.3, n.2, p.232-249, 2011.
- 15 MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C.; GOMES, M.M.A. Condutância estomática,
16 transpiração e fotossíntese em laranjeira ‘valência’ sob deficiência hídrica. **Revista**
17 **Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 1, n. 11, p. 29-34, 1999.
- 18 NEVES, D.M.; COELHO FILHO, M.A.; BELLETE, B.S.; SILVA, M.F.G.F.; SOUZA,
19 D.T.; SOARES FILHO, W.S.; COSTA, M.G.; GESTEIRA, A.S. Comparative study of
20 putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase and abscisic acid accumulation in the
21 responses of Sunki mandarin and Rangpur lime to water deficit. **Molecular Biology**
22 **Reports**, v.40, p. 39-49, 2013.
- 23 NEVES, A.D.; OLIVEIRA, R.F.; PARRA, J.R.P. A new concept for insect damage
24 evaluation based on plant physiological variables. **Anais da Academia Brasileira de**
25 **Ciências**, v. 78, n. 4, p. 821-835, 2006.
- 26 NOGUEIRA, R. J.; MORAES, J. A.P. V. de; BURITY, H. A. Alterações na resistência
27 à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de
28 água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.1, p.75-87, 2001.

- 1 RETUERTO, R., FERNÁNDEZ-LEMA, B.; OBESO, J.R. Increased photosynthetic
2 performance in holly trees infested by scale insects. **Functional Ecology**, v. 18, n. 5, p.
3 664-669, 2004.
- 4 SAMPAIO, A.H.R. Avaliações de combinações copa-porta-enxerto de citros sob déficit
5 hídrico no solo. 2014. 53 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Departamento de
6 Centro de Ciência Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do
7 Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas- BA, 2014.
- 8 SKELLEY, L.H.; HOY, M.A. A synchronous rearing method for the Asian citrus
9 psyllid and its parasitoids in quarantine. **Biological Control**, v.29, p.14-23, 2004.
- 10 STOKSTAD, E. New disease endangers Florida's already-suffering citrus tree. **Science**,
11 v.312, p.523-524, 2006.
- 12 SUASSUNA, J.F., FERNANDES, P.D.; NASCIMENTO, R. Produção de fitomassa em
13 genótipos de citros submetidos a estresse hídrico na formação do porta-enxerto. **Revista**
14 **Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.11, p.1305-1313, 2012.
- 15 TIPPMANN, H.F.; SCHLÜTER, U.; COLLINGE, D.B. Common themes in biotic and
16 abiotic stress signalling in plants. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**,
17 p. 52-67, 2006.
- 18 YAMAMOTO, P.T.. PAIVA, P.E.B.; GRAVENA, S. Flutuação populacional de
19 *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região
20 Norte do estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**, v.1, n.30, p.165-170, 2001.

1



2 **Figura 1.** Perda de umidade dos substratos cultivados com genótipos de citros

3 ‘Valência’ e ‘Sunki Maravilha’ em função do tempo.

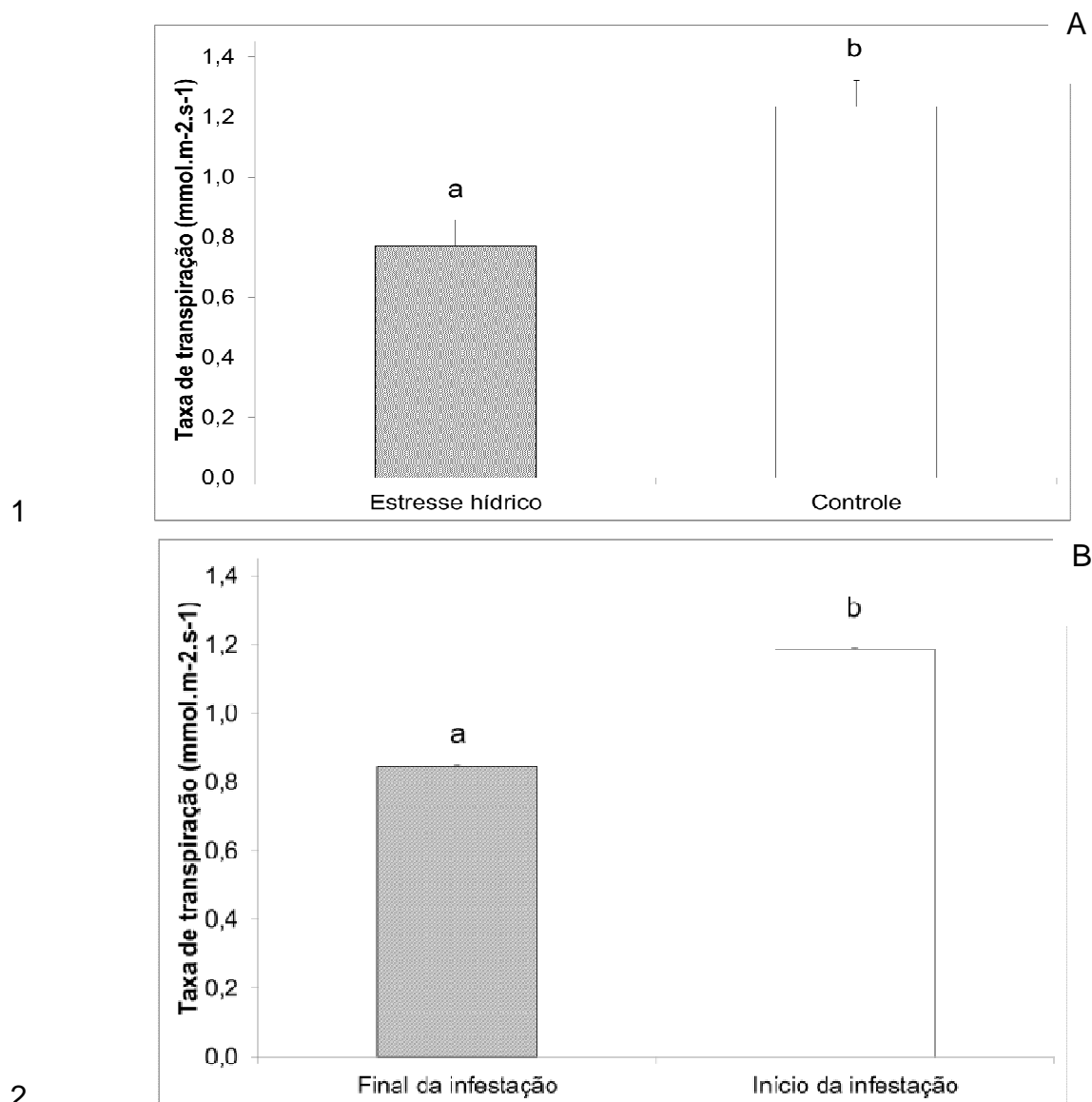


Figura 2. (A) Taxa de transpiração de plantas de citros submetidas ao estresse hídrico e controle (não estressadas), infestadas ou não por adultos de *D. citri*. (B). Taxa de transpiração de plantas de citros no início e final da infestação no período de cinco dias por adultos de *D. citri*. Letras distintas acima das colunas indicam que os tratamentos diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

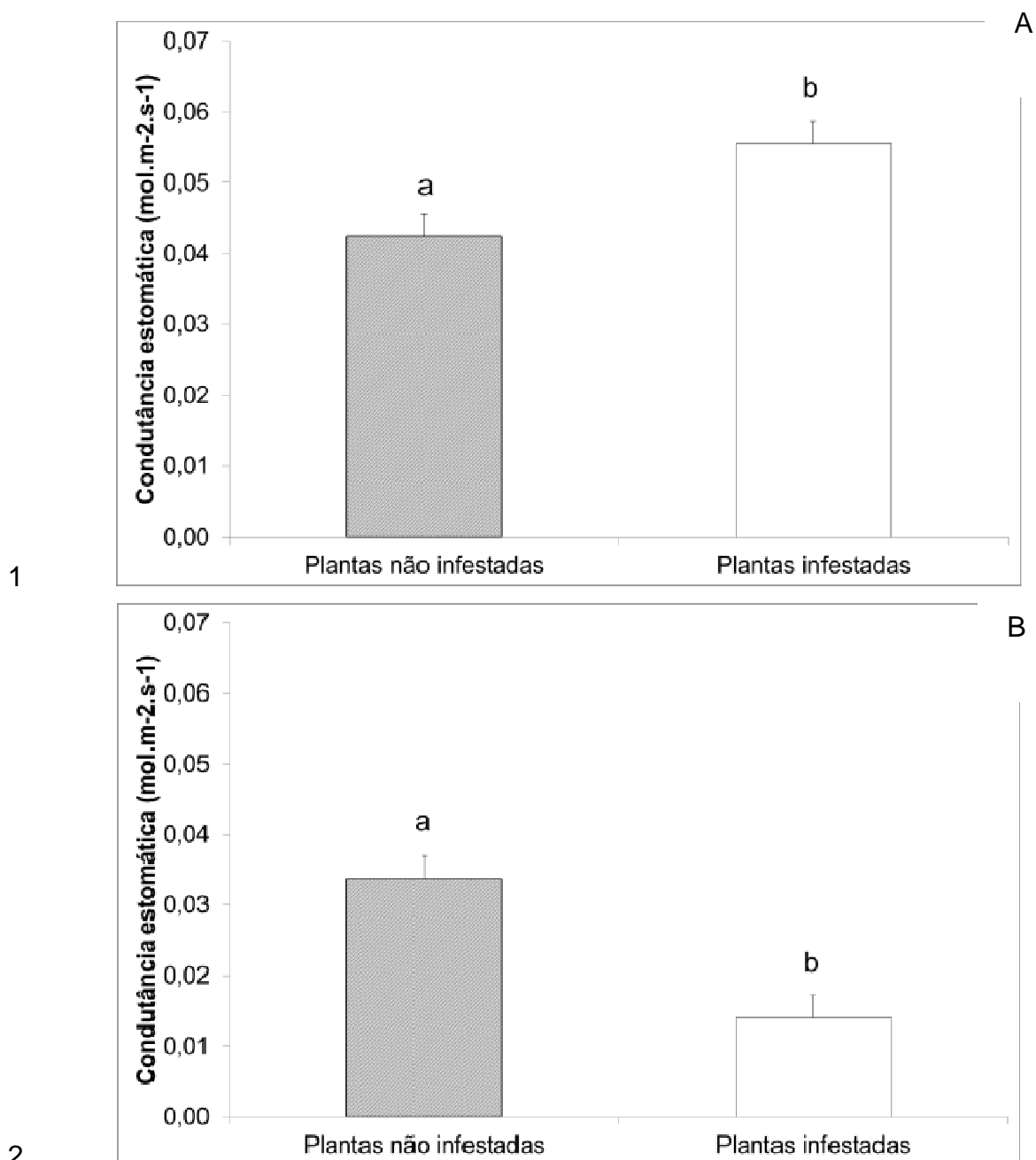
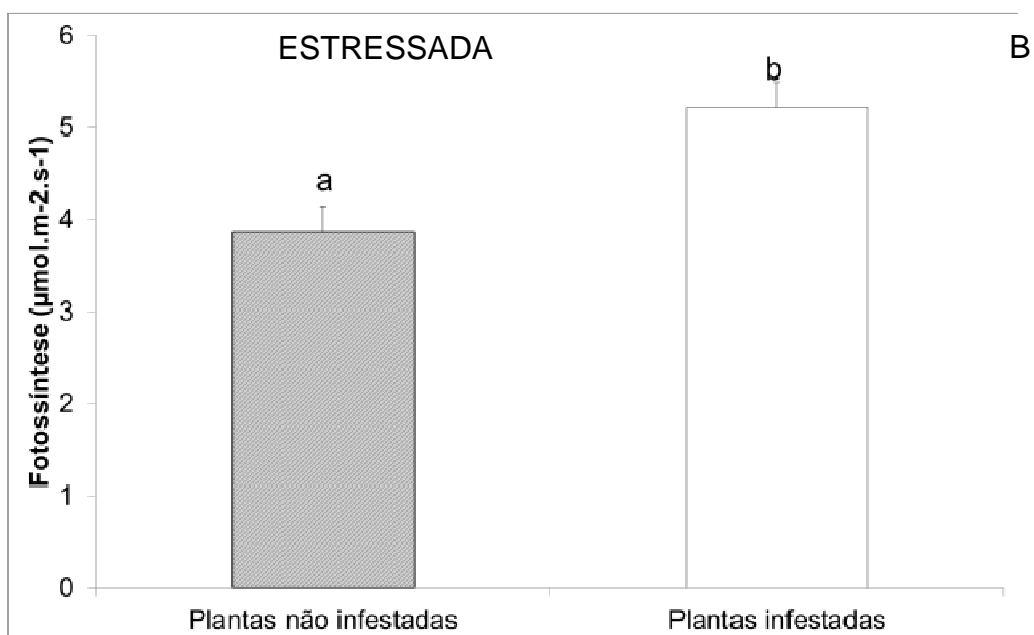


Figura 3. Condutância estomática de plantas de citros não submetidas ao estresse hídrico (A) e estressadas (B), infestadas ou não por adultos de *D. citri*. Letras distintas acima das colunas indicam que os tratamentos diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).



- 1
- 2 **Figura 4.** Taxa de fotossíntese de plantas de citros não submetidas ao estresse hídrico
- 3 (A) e estressadas (B), infestadas ou não por adultos de *D. citri*. Letras distintas acima
- 4 das colunas indicam que os tratamentos diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

1 **Tabela 1.** Média de adultos de *D. citri* /gaiola após cinco dias de confinamento e
 2 porcentagem de insetos vivos e mortos.

Genótipo	Tratamento	Adultos/ gaiola	Adultos vivos*	Adultos mortos*	% vivos	% mortos
'Valência'	Controle	12,43	9,86 a	2,57 a	79,31	20,69
	Estressada	13,13	11,50 a	1,63 a	87,62	12,38
'Sunki Maravilha'	Controle	11,00	9,25 a	1,75 a	84,09	15,91
	Estressada	11,38	8,88 a	2,50 a	78,02	21,98

3 * Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho foi desenvolvido com o objetivo de identificar possíveis alterações proteômicas e fisiológicas induzidas por *Diaphorina citri* Kuwayama em dois genótipos de citros, um porta-enxerto ('Sunki Maravilha') e outro copa ('Valência'), ambos genótipos de relevância para a citricultura nacional.

Em relação à análise proteômica, os genótipos apresentaram perfis proteicos diferenciados mostrando diferentes intensidades entre os tratamentos. Em 'Sunki Maravilha' e Valência', a infestação pelo psíldeo promoveu a detecção de 249 e 191 *spots* exclusivos do tratamento.

Quanto às variáveis fisiológicas observadas nesses dois genótipos em resposta à infestação pelo inseto sob efeito do déficit hídrico, constatou-se aumento da taxa de transpiração das plantas após cinco dias de infestação pelo inseto. Para a condutância estomática, houve interação entre a infestação e o nível de estresse, sendo detectada redução da condutância estomática em plantas infestadas pelo inseto sob estresse hídrico. Nas plantas controle, a infestação pelo inseto aumentou a condutância estomática e a taxa de fotossíntese.

Essas modificações no perfil proteico e nos parâmetros fisiológicos podem indicar ativação de mecanismos de defesa da planta, o que pode dar boas indicações ao programa de melhoramento genético de citros. Entretanto, estudos adicionais para melhor compreensão das respostas da planta ao inseto em associação com estresses abióticos são necessários visando ao desenvolvimento de programas de manejo integrado da praga.

Os resultados obtidos com esses estudos podem fomentar a defesa agropecuária, no desenvolvimento de cultivares resistentes à doença.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, U.C. **Bahia: polos citrícolas, trânsito vegetal e riscos da introdução do Huanglongbing dos citros**, 2012, 65p. Cruz das Almas, BA, 2012. Dissertação (Mestrado em Defesa Agropecuária) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2012.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2015. 104 p.

_____. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2016. 88 p.

AZEVÊDO, C.L.L. **Sistema de Produção de Citros para o Nordeste**. 2013. Embrapa. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/importancia.htm>>. Acesso em: 14 mai. 2016.

BASSANEZI, R. B. et al. **Epidemiologia do Huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença**. Citrus Research & Technology, v.31, n.1, p 11-23, 2010.

BELASQUE JUNIOR, J.B. et al. **Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença**. Tropical Plant Pathology, v.34, n.3, 2009.

BERTOLDE, F.Z. et al. **Efficient method of protein extraction from *Theobroma cacao* L. roots for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry analyses**. Genetics and Molecular Research, v.13, n.3, p.5036-5047, 2014.

BLUMER, S.; POMPEU JUNIOR, J.; GARCIA, V. X. P. Características de qualidade oferecidas por variedades de laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck.) com baixa acidez. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura. **Anais**. 16, Belém, 2006. CD-ROM.

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.

BUENO, A. de F.; BUENO, R. C. O. de F.; NABITY, P. D. **Photosynthetic response of soybean to twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) injury**. Brazilian Archives of Biology And Technology, v. 52, n. 4, p.825-834, 2009.

CERQUEIRA, E. C.; CASTRO N. M. T. de; PEIXOTO, C. P. **Resposta de porta-enxertos de citros ao déficit hídrico**. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 26, n. 3, p.515-519. 2004.

EMBRAPA. **Sistema de Produção de Citros para o Nordeste**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/importancia.htm>>. EMBRAPA, 2003.

FUNDECITRUS. **Principais doenças e pragas, 2014**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/greening/10>> Acesso em: 03/04/2016

GIRARDI, E. A. et al. **Guia de identificação do Huanglongbing (HLB, Ex-greening)**. Cruz das Almas, Bahia : Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011.

GRAFTON-CARDWELL, E.E.; STELINSKI, L.L.; STANSLY, P.A. **Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens**. Annual Review of Entomology, v.58, p 413-432, 2013.

GOTTWALD, T.M.; **Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing**. Annu. Rev. Phytopathol. 2010. 48:119–39.

IBGE. **Produção agrícola municipal (PAM) 2014**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa>. Acesso em: 02/05/2016.

JOHNSON, E.G.; WU, J.; BRIGHT, D.B.; GRAHAM, J.H. **Association of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ root infection, but not phloem**

plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to

appearance of foliar symptoms. Plant Pathology, v. 63, n. 2, p. 290-298, 2014.

LEMOS-FILHO, J. P.; CHRISTIANO, J. C. S.; E ISAIAS, R. M. S. **Efeitos da infestação de insetos galhadores na condutância e taxa relativa de transporte de elétrons em folhas de *Aspidosperma australe* Müell. Arg. e de *A. spruceanum* Benth. ex Müell.** Revista Brasileira de Biociências, v.5, p.1152-1154, 2007.

LOPES, J.M.S. et al. **Importância econômica do citros no brasil**. Revista Científica Eletrônica de Agronomia, 2011.

MACHADO, M.A.; LOCALI-FABRIS, E.C.; COLETTA FILHO, H. D. ***Candidatus Liberibacter* spp., agentes do huanglongbing dos citros**. Citrus Research & Technology, v. 31, n. 1, p. 25-35, 2010.

MAFRA, V. et al. ***Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype.** BMC genomics, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

MALIK, N.S.A. et al. **Changes in free amino acids and polyamine levels in Satsuma leaves in response to Asian citrus psyllid infestation and water stress.** Insect Science, p. 1-10, 2013.

MANJUNATH, K.L. et al. **Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus Huanglongbing in Florida.** Phytopathology, v. 98, n.4, p.387-396, 2008.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus> Acesso em: 01/05/2016

MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C.; GOMES, M.M.A. **Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranjeira 'valência' sob deficiência hídrica.** Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v. 1, n. 11, p. 29-34, 1999.

MEIRELES, K. G. X. Aplicações da proteômica na pesquisa vegetal .Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2007.

MENDES.J.S.; **Análises proteômicas da matriz protéica de cristais de oxalato de cálcio em theobroma cacao e sansevieria sp,**2010,51p. Ilhéus,BA,2010. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

NEVES. M.F. et al.**O retrato da citricultura brasileira.** Ribeirão Preto, SP: Markestrat, 2010.

NOGUEIRA, R. J.; MORAES, J. A.P. V. de; BURITY, H. A. **Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água.** Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v.13, n.1, p.75-87, 2001.

OLIVEIRA,J.M.C de. et al. Estimativa dos impactos econômicos decorrentes de eventual introdução do huanglongbing (HLB) no estado da Bahia. Rev. Bras. Frutic. vol.35 no.3 Jaboticabal Sept. 2013.

PIROVANI, C.P. et al. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**, v. 29, n. 11, p. 2391-2401, 2008.

RETUERTO, R.; FERNÁNDEZ-LEMA; B.; OBESO, J.R. **Increased**

photosynthetic performance in holly trees infested by scale insects.

Functional Ecology, v. 18, n. 5, p. 664-669, 2004.

ROCHA. T. et al. **Eletroforese Bidimensional e análise de proteomas.**EMBRAPA,. Brasília, DF, 2005.

RIBAS, J.; ASSIS, F. Revista do Citricultor, nº 31. Fundecitrus – 2015.

RIVEROS.A.C.AG. et al. **Proteômica: novas fronteiras na pesquisa clinica.** ENCICLOPEDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiania, vol.6, N.11; 2010.

SAMPAIO, A.H.R. **Avaliações de combinações copa-porta-enxerto de citros sob déficit hídrico no solo.** 2014. 53 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Departamento de Centro de Ciência Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas- Ba, 2014. Cap. 1.

SILVA, S. X.de B. **Epidemiologia da mancha graxa dos citros (mycosphaerella citri) no Recôncavo Baiano,** 2008,73p. Cruz das Almas. Dissertação (Mestrado em Defesa Agropecuária), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2008.

SOBRINHO,A.P.C. et al. **Cultura dos citros .** vol 1. Brasília, DF : Embrapa, 2013.

SOUSA. M.; FONTES. W.;RICART.C. A. **Análise proteomas: o despertar da era pós- genoma.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 2014.

SUASSUNA, J.F.; FERNANDES, P.D.; NASCIMENTO, R. **Produção de fitomassa em genótipos de citros submetidos a estresse hídrico na formação do porta-enxerto.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.16, n.11, p.1305-1313, 2012.

SUGAYAMA. R.L. et al. **Defesa Vegetal: Fundamentos, ferramentas, políticas e perspectivas.** Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária. Belo Horizonte, MG, 2015.

TANAKA, F.A.O. et al. **Detection of the "Candidatus Liberibacter americanus" in phloem vessels of experimentally infected cataranthus roseus by scanning electron microscopy.** Fitopatologia Brasileira, v.32, n.6, p.519, 2007.

TEIXEIRA. D.C. et al. **Candidatus Liberibacter americanus, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil.**

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.55, p.1857–1862, 2005.

VALLEDOR. L.; JORRÍN .J .**Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses**, v.74, n.1, p.1-18, 2011 doi: 10.1016/j.jprot.2010.07.007. Epub 2010. 2011

VILAMIU, R.G.A. et al. **A Model for Huanglongbing Spread between Citrus Plants Including Delay Times and Human Intervention**. Published by the American Institute of Physics, 2012.

VYAS, M. et al. **Asian citrus psyllid expression profiles suggest *Candidatus Liberibacter asiaticus*-mediated alteration of adult nutrition and metabolism, and of nymphal development and immunity**. PloS One, v. 10, n. 6, p. e0130328, 2015.

WU .F. et al. **Movement of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) adults between huanglongbing-infected and healthy citrus**. Florida Entomologist, v.98, n.2, p. 410-416, 2009.