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

**Silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi) em traça-do-
tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick), utilizando bactérias expressando dupla
fita de RNA (dsRNA)**

Flavia de Moura Manoel Bento

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2017**

Flavia de Moura Manoel Bento
Engenheira Agrônoma

**Silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi) em traça-do-tomateiro,
Tuta absoluta (Meyrick), utilizando bactérias expressando dupla fita de RNA
(dsRNA)**

Orientador:
Prof. Dr. **ANTONIO VARGAS DE OLIVERA FIGUEIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2017

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

Bento, Flavia de Moura Manoel

Silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi) em traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick), utilizando bactérias expressando dupla fita de RNA (dsRNA) / Flavia de Moura Manoel Bento. - - Piracicaba, 2017.

148 p.

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

1. Silenciamento pós transcricional 2. RNA de interferência 3. Inseto-praga
4. *Escherichia coli* HT115 (DE3) I. Título

*Dedico com amor e carinho aos meus pais Nivaldo e Marlene, ao meu irmão Rodrigo e ao meu
esposo Rodrigo Marques*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me proteger e iluminar meus caminhos, e dando oportunidades para meu desenvolvimento espiritual e profissional e para conclusão de mais esta etapa.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais: Marlene e Nivaldo; meu irmão Rodrigo Bento e meu esposo Rodrigo Marques por todo amor, apoio, incentivo e pela compreensão da minha ausência em muitas ocasiões em razão da conclusão de mais essa etapa na minha vida profissional. Minha imensa gratidão pelo amor incondicional! Amo vocês!

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, pela oportunidade e suporte acadêmico, durante onze anos de minha formação.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – USP, pelo acolhimento e por toda ajuda que me foi oferecida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Figueira, pela oportunidade de trabalhar com genética molecular em sua equipe e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, do Laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ-USP, pela parceria, ensinamentos em todos esses anos e principalmente pela confiança, me permitindo utilizar a estrutura do seu laboratório.

A Prof. Dr^a Maria Caroline Quecine Verdi do Departamento de Genética da ESALQ-USP, pela grande contribuição na parte de bactérias endofíticas desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade e aos professores pelos valiosos ensinamentos transmitidos, em especial a Prof^a Claudia Barros Monteiro Vitorello pelo exemplo de dedicação, profissionalismo e inteligência.

Aos Professores do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP que me transmitiram conhecimentos e o gosto pela Entomologia! Em especial ao Prof. Dr. Fernando Luis Consôli pelos ensinamentos em fisiologia de insetos tão valiosos a execução dessa tese.

Às Professoras Roseli Aparecida Leandro e Clarice Garcia Borges Demetrio e ao doutorando Rafael de Andrade Moral, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de doutorado e auxílio financeiro.

Aos técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP: Felipe Buck Campana, Wlamir Godoy, Paulo Cassieri, Raquel Orsi e Inês Possignolo e aos técnicos do Departamento de Entomologia: Néide Zério, Chico, Dino, William e Edilene pela atenção e por toda ajuda.

A todos os colegas Lampianos (CENA), da Genética e da Entomologia por todos momentos compartilhados e conversas científicas! Agradeço em especial a Dr. Johanna Cuervo Bajonero pelo convívio de criação de *Tuta*, por toda ajuda e pela valiosa contribuição científica para com essa tese: disponibilizar o uso da dieta artificial de *Tuta absoluta*. Também em especial aos amigos lampianos: Daniella Bardella, Felipe B. Campana e Danielle C. Scoton, que contribuíram demais com minha formação prática em genética molecular e que se tornaram amigos pra vida.

A todos estagiários que me auxiliaram em vários experimentos dessa tese.

A todos profissionais da saúde, em especial ao médico ortopedista Arayr Ferrari e ao fisioterapeuta Geraldo Forti, que me auxiliaram no controle das dores do corpo e da alma o que me permitiu a conclusão desse trabalho.

À todos que participaram e contribuíram de maneira direta e indireta para a realização deste trabalho.

"Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe."

Leonardo Da Vinci

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
REFERÊNCIAS	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi) E SEU MECANISMO EM INSETOS	17
2.2. MÉTODOS DE ENTREGA DE dsRNA PARA INSETOS	21
2.3. GENES POTENCIAIS PARA SILENCIAMENTO POR RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi) EM INSETOS	22
2.4. USO DA TÉCNICA DE RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi) COMO MÉTODO DE CONTROLE DE INSETOS PRAGAS AGRÍCOLAS	29
2.5. <i>TUTA ABSOLUTA</i>	31
REFERÊNCIAS	36
3. SILENCIAMENTO GÊNICO DE <i>TUTA ABSOLUTA</i> POR RNA DE INTERFERÊNCIA.....	51
RESUMO.....	51
ABSTRACT	51
3.1. INTRODUÇÃO	52
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.2.1. Criação de <i>Tuta absoluta</i>	54
3.2.2. Material vegetal	55
3.2.3. Escolha dos genes alvos de silenciamento por RNA de interferência (RNAi)	55
3.2.4. Silenciamento utilizando dsRNA sintetizado <i>in vitro</i>	56
3.2.5. Silenciamento gênico utilizando dsRNA produzido por <i>Escherichia coli</i> HT115 (DE3).....	64
3.2.5.1. Clonagem de genes em vetor de silenciamento em plasmídeo L4440	64
3.2.5.2. Culturas eletrocompetentes de <i>Escherichia coli</i> HT115 (DE3)	66
3.2.5.3. Transformação em bactéria <i>Escherichia coli</i> HT115 (DE3).....	67
3.2.5.4. Dieta artificial de <i>Tuta absoluta</i>	67
3.2.5.5. Alimentação de lagartas de <i>Tuta absoluta</i> com dieta artificial contendo dsRNA expresso por <i>Escherichia coli</i> HT115 (DE3)	69
3.2.5.6. Análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)	70
3.3. RESULTADOS	71
3.3.1. Análise de especificidade e clonagem de genes de <i>Tuta absoluta</i> em vetor pGEM-T Easy	71
3.3.2. Análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) de lagartas de <i>Tuta absoluta</i> alimentadas com folha de tomateiro contendo dsRNA transcrito <i>in vitro</i>	77
3.3.3. Confirmação de produção de fita dupla de RNA (dsRNA) por <i>Escherichia coli</i> HT115 (DE3).....	80
3.4. DISCUSSÃO	107

3.5. CONCLUSÕES.....	118
REFERÊNCIAS	118
ANEXO	126
4. ESTUDO DO USO DE BACTÉRIA ENDOFÍTICA COMO MEIO DE ENTREGA DE DUPLA FITA DE RNA (DSRNA) PARA <i>TUTA ABSOLUTA</i>.....	131
RESUMO	131
ABSTRACT.....	131
4.1. INTRODUÇÃO.....	132
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	133
4.2.1. Material vegetal e Insetos	133
4.2.2. Bactérias endofíticas	133
4.2.3. Colonização de bactérias endofíticas em plantas de tomate e lagartas de <i>Tuta absoluta</i>	134
4.2.4. Colonização de bactérias endofíticas em plantas de tomate “Micro-Tom”	135
4.2.5. Microscopia de Fluorescência.....	136
4.2.6. Colonização de bactérias endofíticas em lagartas de <i>Tuta absoluta</i>	136
4.2.7. Reação de PCR de colônia para confirmação de bactérias endofíticas provenientes de reisolamento	137
4.2.8. Transformação de bactéria endofítica com plasmídeo L4440: gene alvo de <i>Tuta absoluta</i>	137
4.2.9. Avaliação do efeito de bactéria endofítica transformadas com plasmídeo pL4440: gene <i>T. absoluta</i>	138
4.2.10. Análises Estatísticas	139
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	139
4.3.1. Colonização de bactérias endofíticas em plantas de tomateiro “Micro-Tom”.....	139
4.3.2. Microscopia de fluorescência.....	140
4.3.3. Colonização de bactéria endofítica em lagartas de <i>T. absoluta</i>	141
4.3.4. Avaliação do efeito de bactéria endofítica transformadas com plasmídeo pL4440: gene <i>T. absoluta</i>	144
4.4. CONCLUSÕES.....	146
REFERÊNCIAS	146

RESUMO

Silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi) em traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick), utilizando bactérias expressando dupla fita de RNA (dsRNA)

O uso da técnica de RNAi vem sendo avaliada em diversos insetos-pragas pois, é uma estratégia inovadora que pode ser integrada no manejo de importantes pragas agrícolas. Os insetos da Ordem Lepidoptera são reconhecidos por apresentarem recalcitrância à técnica de silenciamento utilizando dsRNA. Assim, ajustes devem ser feitos aos métodos de entrega de dsRNA para que haja estabilidade da molécula até atingir o mRNA alvo de silenciamento no inseto. O silenciamento gênico por RNAi possui potencial de uso para o controle da “traça-do-tomateiro” *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), uma das principais pragas do tomateiro no mundo. O objetivo do trabalho foi selecionar e avaliar o silenciamento de genes de *T. absoluta*, utilizando o método de entrega de dsRNA via bactéria *E. coli* HT115 (DE3), disponibilizada em dieta artificial. Também, objetivando a aplicabilidade da utilização de bactérias que se desenvolvam no mesmo hábitat de insetos-pragas, estudou-se a colonização das bactérias endofíticas *Pantoea agglomerans* linhagem 33.1, *Burkholderia* sp. linhagem SCMS54 e *Burkholderia ambifaria* linhagem RZ2MS16 em plantas de tomateiro e lagartas de *T. absoluta*, para posterior transformação e tentativa de utilização como estratégia de entrega de dsRNA para silenciamento de genes alvos de *T. absoluta*. Foram avaliados, por meio da metodologia de dieta artificial, oito genes de *T. absoluta*: *juvenile hormone inducible protein* – *JHP*; *juvenile hormone epoxide hydrolase protein* – *JHEH*; *ecdysteroid 25-hydroxylase* – *PHM*; *chitin synthase A* – *CHI*; *glutathione S-transferase epsilon 2* – *GST*; *carboxylesterase* – *COE*; *alkaline phosphatase* – *AP* e; *arginine kinase* – *AK*. Por meio de avaliação dos parâmetros biológicos (mortalidade larval; duração da fase larval e peso de pupas) e expressão gênica em cinco períodos de alimentação, comprovou-se a eficiência da metodologia na avaliação do silenciamento gênico por RNAi, sendo possível realizar *screening* de grande quantidade de genes e avaliar os efeitos do silenciamento gênico no desenvolvimento de *T. absoluta*. Os genes *AK*, *CHI* e *JHP* apresentaram resultados positivos quanto ao silenciamento gênico e mortalidade larval, sendo promissores para uso de silenciamento por RNAi como estratégia de controle de *T. absoluta*. *Pantoea agglomerans* apresentou os melhores resultados de colonização de plantas de tomateiro “Micro-Tom” e lagartas de *T. absoluta*, além de estarem presentes em tecidos preferencialmente utilizados na alimentação das lagartas. Porém, lagartas não apresentaram diferenças na mortalidade larval ao se alimentarem de plantas de tomateiro “Micro-Tom” inoculadas com bactérias de *P. agglomerans* transformadas.

Palavras-chave: Silenciamento pós transcricional; RNA de interferência; Inseto-praga; *Escherichia coli* HT115 (DE3)

ABSTRACT

Gene silencing by RNA interference (RNAi) in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick), using bacteria expressing double-stranded RNA (dsRNA)

The use of RNAi technique has been evaluated in several insect pests because it is an innovative strategy that can be integrated in the management of important agricultural pests. Insects of the Order Lepidoptera are recognized to present recalcitrance to gene silencing using dsRNA. Thus, adjustments should be done to dsRNA delivery methods to have molecule stability until it reaches the mRNA target for silencing in the insect. Gene silencing by RNAi has potential use to control the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), one of the main insect pests of tomato crop worldwide. The objective of this work was to select and evaluate the silencing of *T. absoluta* genes using dsRNA delivery method via *E. coli* HT115 (DE3) bacterium, offered in artificial diet. Also, aiming the applicability of the use of bacteria growing in the same habitat of insect pests, we evaluate the colonization of the endophytic bacteria *Pantoea agglomerans* strain 33.1, *Burkholderia* sp. strain SCMS54 and *Burkholderia ambifaria* strain RZ2MS16 in tomato plants and *T. absoluta* larvae for further transformation and potential use as dsRNA delivery strategy for silencing target genes of *T. absoluta*. We evaluated eight genes of *T. absoluta*: juvenile hormone inducible protein - *JHP*; juvenile hormone epoxide hydrolase protein - *JHEH*; ecdysteroid 25-hydroxylase - *PHM*; chitin synthase A - *CHI*; glutathione S-transferase epsilon 2 - *GST*; carboxylesterase - *COE*; alkaline phosphatase - *AP* and; arginine kinase - *AK*. Evaluating biological parameters (larval mortality, larval stage duration and pupal weight) and gene expression in five feeding periods, we proved the efficiency of the methodology in the evaluation of gene silencing by RNAi, and evaluated the effects of gene silencing on the development of *T. absoluta*. The genes *AK*, *CHI* and *JHP* presented positive results regarding gene silencing and larval mortality, being promising to use RNAi silencing as a strategy to control *T. absoluta*. *Pantoea agglomerans* showed good results colonizing “Micro-Tom” tomato plants and *T. absoluta* larvae, besides being present in tissues preferentially used by larvae for feeding. However, larvae did not show differences in larval mortality when feeding on tomato plants inoculated with transformed *P. agglomerans*.

Keywords: Post transcriptional silencing; RNA interference; Pest insect; *Escherichia coli* HT115 (DE3)

1. INTRODUÇÃO

O RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo de regulação pós-transcricional, altamente conservado em eucariotos, que controla a expressão do gene em nível de mRNA, dentro de células vivas, sendo desencadeado por fita dupla de RNA (dsRNA) (Fire et al., 1998; Carthew e Sontheimer, 2009).

A técnica de RNAi se tornou uma potencial tecnologia para controle de insetos-pragas agrícolas depois da comprovação do silenciamento gênico em insetos-pragas por meio da ingestão de dsRNA de genes alvos dos insetos, produzidos por plantas transgênicas. O silenciamento gênico prejudicou o desenvolvimento dos insetos e reduziu os danos causados às plantas (Baum et al., 2007; Mao et al., 2007). Desde então, o uso da técnica de RNAi vem sendo avaliada em diversos insetos-pragas pois é uma estratégia inovadora que pode ser integrada no manejo de importantes pragas agrícolas, reduzindo o número de pulverizações de inseticidas, seleção de populações resistentes, problemas de contaminação ambiental e saúde humana (Huvenne e Smagghe, 2010; Xue et al., 2012; Zotti e Smagghe, 2015; Zhang et al., 2017).

Um exemplo da aplicação da técnica de RNAi para controle de insetos-pragas é o lançamento de uma cultivar geneticamente modificada de milho desenvolvida pela Monsanto e liberada para uso comercial, em junho de 2017 pela EPA (“United States Environmental Protection Agency”), nos Estados Unidos da América. A cultivar SMARTSTAX PRO® foi desenvolvida para expressar dsRNA para silenciamento do gene *Snf7* (proteína vacuolar essencial) de *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), importante inseto-praga da cultura do milho (Zhang et al., 2017). O desenvolvimento dessa cultivar foi resultado de uma série de trabalhos envolvendo o mecanismo de RNAi operante nessa espécie e *screening* de genes alvos de *D. virgifera* (Fishilevich et al., 2016).

A sensibilidade e a resposta ao tratamento de RNAi é variável para cada Ordem e espécie de inseto, devido a características fisiológicas, habitats de vida, mecanismos de alimentação e digestão, ou vias metabólicas, sendo necessária a otimização da técnica para cada espécie alvo (Yang e Han, 2014b). Além disso, vários fatores influenciam o sucesso, a aplicabilidade e a eficiência do RNAi, como a escolha do gene, o tamanho do gene, a região da sequência do dsRNA e métodos de entrega de dsRNA utilizados. Este último deve garantir a estabilidade da molécula até atingir o mRNA alvo de silenciamento no inseto (Pereira, 2013; Yu et al., 2013; Rodrigues e Figueira, 2016). Somados a esses fatores, os insetos da Ordem Lepidoptera são reconhecidos por apresentarem recalcitrância à técnica de silenciamento

utilizando dsRNA (Terenius et al., 2011), possivelmente devido a ação de ribonucleases e fatores do ambiente do trato digestório e da hemolinfa desses insetos (Zhang et al., 2017). Assim, para o *screening* de um maior número de genes alvos em lepidópteros torna-se necessário o estabelecimento de métodos de entrega de dsRNA que mantenha a molécula estável até atingir as células alvo de silenciamento no inseto. Lagartas de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com a bactéria *Escherichia coli* HT115 (DE3) produzindo dsRNA apresentaram maior silenciamento gênico e mortalidade do que lagartas que se alimentaram de moléculas de dsRNA sintetizadas *in vitro* para o mesmo gene alvo. A molécula de dsRNA possui maior estabilidade quando interiorizada na célula bacteriana, sugerindo que essa protege a molécula de dsRNA da degradação no trato digestório e hemolinfa deste lepidóptero (Yang e Han, 2014a).

Os resultados positivos da aplicação de RNAi no controle de insetos-pragas motivam a utilização desta técnica em outros insetos que causam danos significativos às culturas agrícolas, como a “traça-do-tomateiro” *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). Os danos desta praga são produzidos pelas lagartas que se alimentam de todos os tecidos e estágios de desenvolvimento do tomateiro (Cifuentes et al., 2011). As fêmeas adultas ovipositam preferencialmente na superfície das folhas, nas quais as lagartas recém eclodidas penetram, fazendo galerias por meio da alimentação do parênquima foliar, diminuindo a área fotossintética da planta e, conseqüentemente, a produção. As lagartas também podem consumir tecidos do caule, brotos e frutos (Galdino et al., 2015). Embora existam diversas táticas de manejo utilizadas para *T. absoluta*, como controle cultural, varietal e biológico, o uso de inseticidas ainda é o método de controle mais utilizado (Guedes e Picanço, 2012). Porém, o hábito minador das lagartas faz com que esta praga seja um alvo difícil de ser atingido, havendo falha no controle e, conseqüentemente, estimulando o aumento do número de aplicações com inseticidas, elevando os custos financeiros e ambientais (Benvença et al., 2007; Guedes e Picanço, 2012). Neste sentido, novas estratégias integradas ao controle químico, como o silenciamento gênico por RNAi, são almejadas para a eficácia de controle dessa praga.

O silenciamento gênico de dois genes de metabolismo basal energético (*Vacuolar ATPase catalytic subunit A*, *V-ATPase* e *Arginine kinase*, *AK*) foi demonstrado em *T. absoluta* utilizando a metodologia de entrega baseada em folíolos de plantas de tomateiro destacados e imersos em solução de dsRNA (Camargo et al., 2016). Porém, essa metodologia sofre grandes influências ambientais e impossibilita isolar a interferência da planta sobre os efeitos do tratamento de RNAi. A utilização de uma dieta artificial para *T. absoluta* possibilitaria o

controle dos componentes alimentares oferecidos aos insetos, o que se tornou possível após o desenvolvimento da dieta específica para *T. absoluta* proposta por Bajonero e Parra (2017). Aliado a isso, as sequências gênicas disponibilizadas pelo transcrito de *T. absoluta* (Camargo et al., 2015) possibilitam estudos com maior número de genes alvos ao silenciamento gênico, sendo esses essenciais ao desenvolvimento desta espécie evitando os *off-targets* em outros organismos.

Neste sentido, no presente trabalho foi realizada uma seleção de genes de *T. absoluta* a partir de seu transcrito (Camargo et al., 2015) e avaliação do silenciamento desses genes, utilizando o método de entrega de dsRNA via bactéria *E. coli* HT115 (DE3), disponibilizada em dieta artificial. Também, objetivando a aplicabilidade da utilização de bactérias que se desenvolvam no mesmo hábitat de insetos-pragas, estudou-se a colonização de bactérias endofíticas em plantas de tomateiro para posterior transformação e tentativa de utilização como estratégia e método de entrega de dsRNA para silenciamento de genes alvos de *T. absoluta*.

Referências

- Bajonero, J.G; Parra, J.R.P. Selection and suitability of an artificial diet for *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) based on physical and chemical characteristics. **Journal of Insect Science**, v. 17, p. 1-8, 2017.
- Baum, J.A.; Bogaert, T.; Clinton, W.; Heck, G.R.; Feldmann, P.; Ilagan, O.; Johnson, S.; Plaetinck, G.; Munyikwa, T.; Pleau, M.; Vaughn, T.; Roberts, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1322-1326, 2007.
- Benvenga, S.R.; Fernandes, O.A.; Gravena, S. Tomada de decisão de controle da traça-do-tomateiro através de armadilhas com feromônio sexual. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 164-169, 2007.
- Camargo, R.A.; Herai, R.H.; Santos, L.N., Bento, F.M.M.; Lima, J.E.; Marques-Souza, H.; Figueira, A. De Novo transcriptome assembly and analysis to potential gene targets for RNAi-mediated control of the tomato leafminer (*Tuta absoluta*). **BMC Genomics**, v.16. p.1-17, 2015.
- Camargo, R.A.; Barbosa G.O.; Possignolo, I.P.; Peres, L.E.P.; Lam, E.; Lima, J.E.; Figueira, A.V.O; Marques-Souza, H. RNA interference as a gene silencing tool to control *Tuta absoluta* in tomato (*Solanum lycopersicum*). **PeerJ Preprints**, v. 4, e2406v1, 2016.
- Carthew, R.; Sontheimer, E. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, p. 642-655, 2009.

Cifuentes, D.; Chynoweth, R.; Bielza, P. Genetic study of mediterranean and south american populations of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Povolny, 1994) (Lepidoptera: Gelechiidae) using ribosomal and mitochondrial markers. **Pest Management Science**, v. 67, p. 1155-1162, 2011.

Fishilevich, E.; Vélez, A.M.; Storer, N.P.; Li, H.; Bowling, A.J.; Rangasamy, M.; Worden, S.E.; Narva, K.E.; Siegfried, B.D. RNAi as a management tool for the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. **Pest Management Science**, v. 72, p. 1652–1663, 2016.

Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

Galdino, T.V.S.; Picanço, M.C.; Ferreira, D.O.; Silva, G.A.R.; Souza, T.C.; Silva, G.A. Is the performance of a specialist herbivore affected by female choices and the adaptability of the offspring? **Plos One**, v. 10, e0143389, 2015.

Guedes, R.N.C.; Picanço, M.C. The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. **EPPO Bulletin**, v. 42, p. 211–216, 2012.

Huvenne, H.; Smagghe, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 227-235, 2010.

Mao, W.; Rupasinghe, S.G.; Johnson, R.M.; Zangerl, A.R.; Schuler, M.A.; Berenbaum, M.R. Quercetin-metabolizing CYP6AS enzymes of the pollinator *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 154, p. 427-434, 2009.

Pereira, T.C. **Introdução à técnica de Interferência por RNA-RNAi**. Pereira, T.C. (Coord.). Sociedade Brasileira de Genética: Ribeirão Preto, Ed. Cubo, 2013. 170p

Rodrigues, T.B.; Figueira, A. Management of insect pest by RNAi: a new tool for crop protection. In: Abdurakhmonov, I. (Ed.). **RNA Interference**. 1ed. InTech: Rijeka, 2016. Cap. 18, p. 371-390.

Terenius, O.; Papanicolaou, A.; Garbutt, J.S.; Eleftherianos, I.; Huvenne, H.; Kanginakudru, S.; Albrechtsen, M.; An, C.; Aymeric, J.L.; Barthel, A.; Bebas, P.; Bitra, K.; Bravo, A.; Chevalier, F.; Collinge, D.P.; Crava, C.M.; Maagd, R.A.; Duvic, B.; Erlandson, M.; Faye, I.; Felföldi, G.; Fujiwara, H.; Futahashi, R.; Gandhe, A.S.; Gatehouse, H.S.; Gatehouse, L.N.; Giebertowicz, J.M.; Gómez, I.; Grimmelikhuijzen, C.J.P.; Groot, A.T.; Hauser, F.; Heckel, D.G.; Hegedus, D.D.; Hrycaj, S.; Huang, L.; Hull, J.J.; Iatrou, K.; Iga, M.; Kanost, M.R.; Kotwica, J.; Li, C.; Li, J.; Liu, J.; Lundmark, M.; Matsumoto, S.; Meyering-Vos, M.; Millichap, P.J.; Monteiro, A.; Mrinal, N.; Niimi, T.; Nowara, D.; Ohnishi, A.; Oostra, V.; Ozaki, K.; Papakonstantinou, M.; Popadic, A.; Rajam, M.V.; Saenko, S.; Simpson, R.M.; Soberón, M.; Strand, M.R.; Tomita, S.; Toprak, U.; Wang, P.; Wee, C.W.; Whyard, S.; Zhang, W.; Nagaraju, J.; French-Constant, R.H.; Herrero, S.; Gordon, K.; Swevers, L.; Smagghe, G. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 231-245, 2011.

- Xue, X.Y.; Mao, Y.B.; Tao, X.Y.; Huang, Y.P.; Chen, X.Y. New approaches to agricultural insect pest control based on RNA interference. **Advances in Insect Physiology**, v. 42, p. 73-117, 2012.
- Yang, J.; Han, Z. Efficiency of different methods for dsRNA delivery in Cotton Bollworm (*Helicoverpa armigera*). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, p. 115-123, 2014a.
- Yang, J.; Han, Z. Optimisation of RNA interference-mediated gene silencing in *Helicoverpa armigera*. **Australian Entomology**, v. 53, p. 83-88, 2014b.
- Yu, N.; Christiaens, O.; Liu, J.; Niu, J.; Cappelle, K.; Caccia, S.; Huvenne, H.; Smagghe, G. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. **Insect Science**, v. 20, p. 4–14, 2013.
- Zotti, M.J.; Smagghe, G. RNAi technology for insect management and protection of beneficial insects from diseases: lessons, challenges and risk assessments. **Neotropical Entomology**, v. 44, p. 197–213, 2015.
- Zhang, J.; Khan, S.A.; Heckel, D.G.; Bock, R. Next-Generation Insect-Resistant Plants: RNAi-Mediated Crop Protection. **Trends in Biotechnology**, v. 35, p. 871-882, 2017.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) e seu mecanismo em insetos

RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo de regulação pós-transcricional, altamente conservado em eucariotos, que controla a expressão do gene, em nível de mRNA, dentro de células vivas (Fire et al., 1998; Carthew e Sontheimer, 2009; Bellés, 2010; Berezikov, 2011; Zhuang e Hunter, 2012). A conservação evolucionária deste mecanismo de regulação pós-transcricional gênico é hipotetizada como a representação de uma resposta ativa do organismo contra infecções virais e mobilização de elementos genéticos transponíveis (Ding, 2010).

Fire et al. (1998) descreveram o processo de silenciamento de mRNA endógeno por meio da aplicação de dsRNA exógeno no nematóide *Caenorhabditis elegans*. Embora este processo tenha sido inédito em animais, este fenômeno já fora descrito em plantas como “Silenciamento Gênico Pós-transcricional – PTGS” e como “Quelling” em levedura (*Neurospora* spp.) (Maia, 2013).

Atualmente, sabe-se que os organismos eucariotos possuem mecanismos comuns de silenciamento gênico por meio de RNAi, incluindo fungos, plantas, insetos e mamíferos (Mello e Conte, 2004). O uso da técnica de RNAi ampliou o entendimento da regulação gênica em diversos organismos e emergiu rapidamente como uma poderosa abordagem para estudos de funções de genes em vários organismos, silenciamento gênico em eucariotos e também em estudos na medicina para tratamento de cânceres e controle de doenças virais (Huvenne e Smaghe, 2010). Na biotecnologia, representa grande potencial devido à sua alta especificidade, além do seu potencial de uso como um novo método para controlar insetos pragas na agricultura (Gordon e Waterhouse, 2007; Price e Gatehouse, 2008; Huvenne e Smaghe 2010; Bellés, 2010; Aronstein et al., 2011; Xue et al., 2012; Zhu, 2013; Rodrigues e Figueira, 2016).

O mecanismo de RNAi é desencadeado a partir de qualquer fita dupla de RNA (dsRNA) de origem exógena (rota do siRNA) ou endógena (rota do miRNA) à célula (Figura 1). Quando uma molécula de dsRNA endógena (pré-miRNA) ou exógena (uma infecção por um vírus ou manipulação de laboratório) é expressa ou introduzida dentro da célula, esta é processada em microRNA ou siRNA, ou seja, em pequenos RNAs, por uma endoribonuclease da família da RNaseIII, chamada Dicer. Esses RNAs são pequenos fragmentos de dsRNA, de cerca de 21-23 pares de bases (Burand e Hunter, 2013; Zotti e Smaghe, 2015). Na via de

RNAi, os pequenos RNAs (miRNA ou siRNA) são incorporados a um complexo de silenciamento induzido, conhecido como RISC (*RNA-induced silencing complex*), conjuntamente com uma proteína de multi-domínio chamada Argonauta (Ago). Ago contém uma RNaseH como domínio responsável pela clivagem de degradação e descarte de uma das fitas dos pequenos RNAs, fita senso, conduzindo à um RISC ativo (Ketting, 2011). Assim, a fita senso da fita dupla dos pequenos RNAs será degradada e a fita remanescente, anti-senso, servirá de guia para o RISC encontrar o mRNA homólogo a fita anti-senso. O RISC ao encontrar o mRNA homólogo cliva a fita guia anti-senso dos pequenos RNAs (miRNA e siRNA) e então este mRNA homólogo é degradado, diminuindo ou suprimindo assim a expressão do gene (Ketting, 2011; Zhu, 2013; Burand e Hunter, 2013; Zotti e Smagghe, 2015).

O mecanismo de RNAi descrito acima ocorre dentro da célula e é denominado como mecanismo celular autônomo (Figura 2) (Whangbo e Hunter, 2008; Huvenne e Smagghe, 2010). Quando a molécula de dsRNA é absorvida pela célula ou transportada de uma célula para outra, ou tecidos diferentes, o mecanismo de RNAi é denominado de não autônomo (Figura 2) (Whangbo e Hunter, 2008; Huvenne e Smagghe, 2010). Assim, o mecanismo de RNAi celular não autônomo envolve dois tipos de processos: o de absorção (também chamado de “environmental”) e o sistêmico (“systemic”) (Figura 2) (Huvenne e Smagghe, 2010). A absorção compreende todos os processos nos quais o dsRNA disponível em um meio é absorvido por uma célula ou grupo de células. O processo sistêmico do RNAi ocorre quando o sinal de silenciamento é transportado da célula em que o dsRNA foi aplicado ou expresso para outras células ou tecidos, havendo silenciamento gênico nestes novos locais (Huvenne e Smagghe, 2010; Joga et al., 2016). Dessa maneira, os processos de absorção e sistêmico são de grande importância para o espalhamento do sinal de RNAi no corpo do inseto, garantindo a possibilidade do seu uso eficiente no controle de insetos-pragas. Para que o inseto internalize o dsRNA de um gene alvo de silenciamento, esse terá que ser absorvido pela(s) célula(s), e por vezes, transportado de uma célula para outra ou de um tecido para outro, de forma sistêmica (Huvenne e Smagghe, 2010).

Em insetos, diferentemente de nematoides, duas vias de absorção de dsRNA foram descritas: por meio do canal da proteína de membrana, *systemic RNAi defective (SID-1)*, e pela via de endocitose (Joga et al., 2016). Em nematoides, o gene *SID-2* codifica uma proteína de membrana situada nas células intestinais (McEwan et al., 2012). A proteína *SID-2* importa dsRNA do lúmen intestinal através da endocitose e exporta os dsRNAs para células vizinhas através de canais *SID-1* por meio de movimento passivo (Whangbo e Hunter, 2008; McEwan

et al., 2012). Nesse caso, a absorção do dsRNA necessita da ação das proteínas *SID-1* e *SID-2*. As proteínas *SID* ou *SID*-like (*SIL*) foram identificadas nos insetos, mas não está claro se os homólogos *SID* / *SIL* contribuem para a absorção de dsRNA em todos os insetos (Fishilevich et al., 2016). Mecanismos moleculares no processo de absorção de dsRNA pelas células podem ocorrer diferentemente de acordo com a espécie e a Ordem estudada. As proteínas *SID* e *SIL* parecem estar completamente ausentes em Diptera (Roignant et al., 2003; Tomoyasu et al., 2008). Os genes de *SID-1* parecem estar presentes na maioria das espécies de insetos, mas até agora não foram encontrados genes de *SID-2* nas espécies cujos genomas foram sequenciados (Joga et al., 2016). No transcrito de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) foram encontrados homólogos de *SID-1* mas não foram encontrados de *SID-2* (Camargo et al., 2015). Outros relatos sugerem que a resposta do RNAi não é dependente de proteínas *SID* ou *SIL* em espécies de Orthoptera e Lepidoptera (Luo et al., 2012; Wang et al., 2014). Isso não implica que a função das proteínas *SID* para a absorção e disseminação sistêmica de RNAi possa ser descartada completamente em insetos (Fishilevich et al., 2016).

Outra diferença importante entre insetos e nematoides é encontrada quando se verifica a amplificação do siRNA no sistema RNAi. Em contraste com a absorção de dsRNA, não há informações disponíveis sobre o transporte de dsRNA/siRNA dentro do corpo de insetos e qual sistema está envolvido neste processo (Huvenne e Smagghe, 2010; Joga et al., 2016). No entanto, o sistema de RNAi sistêmico, tal como existe em nematoides, não está presente em insetos. Em *C. elegans*, os siRNAs secundários são sintetizados por uma RNA-polimerase dependente de RNA (RdRP), que amplifica o sinal silenciador. Em insetos, nenhum homólogo canônico para este RdRP foi descoberto até o momento (Joga et al., 2016). Porém, em algumas espécies de coleópteros, como *D. virgifera*, o efeito do RNAi é altamente eficiente e duradouro, evidenciando a possibilidade da existência do mecanismo sistêmico de RNAi nesse grupo de insetos, incluindo ou não uma amplificação de siRNA (Fishilevich et al., 2016). Por outro lado, outras Ordens de insetos exigem grandes quantidades de dsRNA para provocar um efeito moderado, que muitas vezes é de curta duração, como em Hemiptera e Lepidoptera (Lehane, 1997; Silva et al., 2004; Hegedus et al., 2009). A absorção de dsRNA pelas células epiteliais do intestino médio do inseto é fundamental para a eficácia da resposta do RNAi. Não está claro até que ponto a membrana perimicrovilar no mesêntero de espécies de Hemiptera (Silva et al., 2004) ou a membrana peritrófica no mesêntero de Coleoptera e Lepidoptera atua como uma barreira física para a entrega de dsRNA (Lehane, 1997; Hegedus et al., 2009; Joga et al., 2016). Sendo assim, para a avaliação da eficiência do silenciamento

por RNAi deve-se considerar a forma de entrega do dsRNA e o gene alvo a ser silenciado (Scott et al., 2013).

Figura 1. Mecanismo de RNA de Interferência (RNAi) dentro da célula, rota de miRNA e siRNA (adaptado de Zotti e Smaghe, 2015).

Figura 2. Mecanismo de RNAi celular autônomo e não autônomo com os processos absorção e sistêmico (adaptado de Huvenne e Smaghe, 2010).

2.2. Métodos de entrega de dsRNA para insetos

Diversas formas de entrega de dsRNA aos insetos foram desenvolvidas, incluindo microinjeções em ovos (Quan et al., 2002; Fabrick et al., 2004; Tsuzuki et al., 2005; Liu et al., 2008; Masumoto et al., 2009; Pan et al., 2009; Tomita e Kikuchi, 2009); microinjeções em regiões específicas do organismo (Bettencourt et al., 2002; Hirai et al., 2004; Terenius et al., 2007; Yokoi et al., 2013); embebimento de células com solução (*soaking*) contendo dsRNA (Clemens et al., 2000; Beck e Strand 2005; Sivakumar et al., 2007; March e Bertley, 2007; Shah e Forstemann, 2008; Xu et al., 2013); transfecção de célula seguido por *soaking* em solução de dsRNA (Johnson et al., 2010); *soaking* de ovos com solução de dsRNA; pulverização de solução de dsRNA em lagartas (Wang et al., 2011); ou via ingestão. Esse último pode ser administrado pela adição de dsRNA sintetizado *in vitro* em dieta (Turner et al., 2006; Bautista et al., 2009; Whyard et al., 2009; Yang et al., 2010; Khajuria et al., 2010; Upadhyay et al., 2011; Asokan et al., 2014; Galdeano et al., 2017); aplicação de dsRNA sintético em plantas (Hunter et al., 2012; San Miguel e Scott 2015; Li et al., 2015); ingestão de planta transgênica expressando dsRNA; por adição de bactérias que expressem as sequências de dsRNA às dietas artificiais dos insetos (Tian et al., 2009; Perrimon et al., 2010) e por nanoencapsulação de dsRNA sintético (Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2015b).

Quando o objetivo é avaliar os efeitos do silenciamento gênico no desenvolvimento do inseto ou com a finalidade de estratégia de controle de pragas, métodos de entrega não invasivos e mais próximos das condições reais de fonte exógena de dsRNA são desejados, e o método de ingestão se adequa a esses objetivos (Terenius et al., 2011). Além disso, o método de entrega de dsRNA deve garantir a estabilidade da molécula de dsRNA dentro do organismo do inseto até atingir a célula na qual o gene alvo está sendo expresso, principalmente em Ordens de inseto com baixa resposta ao silenciamento por RNAi (recalcitrantes), como Diptera e Lepidoptera (Tian et al., 2009; Terenius et al., 2011; Yang e Han, 2014a; Shi et al., 2016; Zhang et al., 2017).

Com o intuito de aumentar a estabilidade da molécula de dsRNA, o método de nanoencapsulação de dsRNA foi utilizado por Zhang et al. (2010), que alimentaram larvas de *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) com nanopartículas de quitosana envolvendo dsRNA do gene *chitin synthase* (*AgCHSI*). Zhang et al. (2015b) também demonstraram que o uso de nanopartículas de quitosana/dsRNA entregues por ingestão a larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) aumenta a eficiência do silenciamento gênico.

Em Lepidoptera, o pH alcalino do intestino das lagartas e a ação de enzimas RNase III são apontados como as possíveis causas da degradação do dsRNA, quando esse é exposto ao aparelho digestório do inseto (Zhang et al., 2013; Zhang et al., 2015a; Xu et al., 2016; Lamontagne et al., 2001; Terenius et al., 2011; Garbutt et al., 2013; Wang et al., 2016). Assim, entre as principais estratégias de entrega de dsRNA via ingestão, aquela que utiliza bactérias que expressam dsRNA demonstra potencial para uso em silenciamento gênico em espécies de Lepidoptera (Tian et al., 2009; Yang e Han, 2014a; Shi et al., 2016). Lagartas de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com dieta artificial contendo bactérias *E. coli* HT115 (DE3), que expressavam dsRNA correspondente a um gene *chitin synthase A* (*SeCHSA*), apresentaram alteração no desenvolvimento e mortalidade superior em comparação ao controle, bem como a redução da expressão do alvo *SeCHSA* (Tian et al., 2009). Em *H. armigera*, a mortalidade de lagartas aumentou em 27% quando alimentadas com bactérias *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA para silenciamento do gene *CYP6B6* do citocromo P450 (Zhang et al., 2013).

Yang e Han (2014a) compararam métodos de entrega de dsRNA para lagartas de *H. armigera*: microinjeção, ingestão de dsRNA sintetizado *in vitro* (uma vez e com reoferta diária) e ingestão contínua de bactéria *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA. O método mais eficiente foi a ingestão contínua de bactérias expressando dsRNA, que reduziu a taxa de pupação em 68,7% e aumentou a mortalidade larval em 34,1%. Foi verificado também que o dsRNA foi degradado mais rápido no suco intestinal do que na hemolinfa das lagartas. No entanto, as células de bactéria protegeram o dsRNA e retardaram a degradação no suco intestinal. Testes com a lagarta *Mythimna separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) comprovaram o sensível aumento na mortalidade de lagartas que se alimentaram durante sete dias em dieta contendo bactérias *E. coli* HT115 (DE3) que expressavam dsRNA homólogos a dois genes de *chitinase* (Ganbaatar et al., 2017). Nesses ensaios, também foi observada a redução no peso das lagartas e redução na expressão dos dois genes quando alimentadas com bactérias expressando dsRNA, demonstrando a eficiência deste método de entrega de dsRNA, sendo o mais adequado para seleção de novos genes alvos de silenciamento.

2.3. Genes potenciais para silenciamento por RNA de interferência (RNAi) em insetos

Para a utilização da técnica de RNAi como método de controle de insetos, a primeira etapa é a identificação dos genes alvos de silenciamento para a espécie que se está estudando (Baum et al., 2007; Rodrigues et al., 2017). A seleção de genes alvos de silenciamento é de

extrema importância para eficiência da técnica de RNAi e para garantir a especificidade do gene, evitando efeitos de silenciamento em organismos não alvo (Arakane et al., 2005; Martin et al., 2006; Turner et al., 2006; Chen et al., 2008; Tian et al., 2009). De maneira geral, dsRNA de genes essenciais à fisiologia e desenvolvimento de insetos com baixa redundância (cópia única) e compensação de função, possuem potencial de provocar efeitos fatais por RNAi e, portanto, maior probabilidade na redução de populações de pragas (Yang e Han, 2014b).

O sucesso evolutivo dos insetos é atribuído ao desenvolvimento da cutícula, que é um exoesqueleto complexo com diversas funções. Os principais componentes estruturais da cutícula são a quitina, diversas proteínas cuticulares, lipídios, catecolaminas e minerais (Zhu et al., 2016). O exoesqueleto suporta a ligação muscular para locomoção, evita danos físicos e químicos e protege o inseto contra doenças infecciosas e perda de água (Zhu et al., 2016). A quitina também é encontrada nas estruturas internas de muitos insetos e outros artrópodes, incluindo revestimentos cuticulares internos do canal alimentar, sistema traqueal, digestório, dutos genitais e dutos das várias glândulas dérmicas. Os canais alimentares da maioria dos insetos contém uma membrana peritrófica quitinosa (MP), que é um tubo acelular e poroso que reveste o epitélio do intestino médio (Kramer e Muthukrishnan, 2005). A MP é um componente essencial do trato intestinal do inseto que envolve o bolo alimentar e compartimentaliza a digestão. Também protege as células epiteliais subjacentes de danos mecânicos por partículas de alimentos ásperas, de danos químicos por toxinas e de infecções causadas por microorganismos. Como a quitina forma uma parcela significativa do exoesqueleto e da MP, que é regularmente substituída, a síntese da quitina é crucial para o crescimento e o desenvolvimento de artrópodes. A *chitin synthase* (quitina sintase) é uma enzima que catalisa o passo final da biossíntese da quitina. Em geral, os genes de *chitin synthase* de insetos são categorizados nas classes A e B, de acordo com o tipo de célula em que são expressos (Merzendorfer, 2006; Tian et al., 2009; Shi et al., 2016). Os genes de *chitin synthase A* são expressos especificamente em células ectodérmicas, incluindo as células epidérmicas e das traquéias, enquanto que os genes de *chitin synthase B* são restritos às células epiteliais do intestino que produzem a MP do mesêntero (Shi et al., 2016). A quitina é encontrada principalmente em artrópodes e fungos, mas não encontradas em vertebrados e em plantas (Merzendorfer, 2006); assim, os genes envolvidos com a síntese de quitina são alvos interessantes de silenciamento para o controle dos processos regulatórios de crescimento do inseto (Shi et al., 2016). Diversos trabalhos visando silenciamento gênico de insetos

utilizando a técnica de RNAi utilizaram como alvo genes da *chitin synthase* e obtiveram resultados satisfatórios (Tian et al., 2009; Kelkenberg et al., 2015; Shi et al., 2016).

Além da quitina, as mucinas, um tipo de peritrofina, são proteínas que fazem parte da composição da MP do intestino dos insetos. Israni e Rajam (2017) utilizaram como gene alvo de silenciamento por RNAi o *insect intestinal mucin (IIM)*. Para isto, alimentaram lagartas de *Plutella xylostella* e *H. armigera* com dieta contendo bactérias *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *IIM* e observaram redução significativa da expressão gênica. Essa alteração resultou em melanização e crescimento reduzido das lagartas de *P. xylostella* e mortalidade significativamente maior (50%) em lagartas de *H. armigera*.

O sucesso dos insetos herbívoros é relacionado principalmente à sua capacidade de superar os desafios apresentados pela fonte de alimentos. As plantas, por outro lado, se defendem dos insetos herbívoros por meio de defesas químicas, que podem ser constitutivamente produzidas ou induzidas pela herbivoria. Essas defesas incluem toxinas, dificultantes de alimentação e sinais voláteis para atrair os inimigos naturais dos herbívoros (Vogel et al., 2014). De modo geral, as defesas empregadas por uma determinada espécie de planta são eficazes contra a grande maioria das espécies de potenciais herbívoros que podem encontrá-la, mas uma ou poucas espécies de insetos podem ter desenvolvido medidas necessárias para superar essas defesas e completar seu ciclo de vida explorando a planta como fonte de alimento. Esses insetos são denominados de especialistas (Heckel, 2014). Assim, enquanto os insetos generalistas enfrentam uma série de estratégias de defesas de plantas, precisando utilizar diversas táticas de detoxificação (ou desintoxicação), os insetos especialistas necessitam realizar apenas ajustes em sua adaptação às defesas da planta (Vogel et al., 2014). A maioria das espécies de insetos herbívoros é especialista, se desenvolvendo em pequenos grupos de espécies e famílias de plantas hospedeiras, que empregam os mesmos tipos de defesas químicas, desintoxicando-as de forma eficaz (Heckel, 2014). Para neutralizar vários aleloquímicos tóxicos ou xenobióticos das folhas das plantas hospedeiras, os insetos obtiveram evolutivamente vários sistemas enzimáticos para detoxificação desintoxicação, incluindo citocromo P450s (CYP), *glutathione S-transferases* (GSTs) e *carboxylesterase* (COEs) (Li et al., 2007). Alguns dos genes relacionados a estes sistemas enzimáticos de detoxificação de aleloquímicos ou xenobióticos de plantas são listados na Tabela 1.

Tabela 1. Genes relacionados à detoxificação ou desintoxicação de aleloquímicos tóxicos ou xenobióticos de plantas com a respectiva espécie de inseto. *CYP* = citocromo P450, *GST*= *Glutathione transferase*,

Espécie de inseto	Gene	Referência
<i>Papilio polyxenes</i>	<i>CYP6B1, CYP6B3</i>	Wen et al. (2003; 2006)
<i>Helicoverpa zea</i>	<i>CYP6B8, CYP323A1</i>	Sasabe et al. (2004); Rupasinghe et al. (2011)
<i>Apis mellifera</i>	<i>CYP6AS</i>	Mao et al. (2009)
<i>Helicoverpa armigera</i>	<i>CYP6AE14</i>	Mao et al. (2007; 2011)
<i>Amyelois transitella</i>	<i>CYP6AB11</i>	Niu et al. (2011)
<i>Helicoverpa armigera</i>	<i>GST1</i>	Mao et al. (2007)
<i>Manduca sexta</i>	<i>GST1, GST2</i>	Snyder et al. (1995)
<i>Plutella xylostella</i>	<i>GSTs, Carboxylestares</i>	You et al. (2013)
<i>Spodoptera litura</i>	<i>GSTe1, GSTe3, GSTs1, GSTs3</i>	Huang et al. (2011)

Glutathione S- transferase é uma família de enzimas envolvidas na detoxificação (desintoxicação) de xenobióticos, metabólitos endógenos e produtos químicos exógenos (Li et al., 2007; Vogel et al., 2014; Heckel, 2014). A maioria das enzimas GST catalisam a conjugação intracelular entre glutathione (GSH) e uma ampla gama de compostos exógenos e endógenos, tornando-os mais solúveis e mais fáceis de excretar ou catabolizar (Zhou et al., 2013). Mais de 200 genes *GST* foram validados em oito genomas de insetos e agrupados em duas classes, citosólica e microsomal, e as citosólicas foram categorizadas em seis principais de subclasses (Delta, Epsilon, Omega, Sigma, Theta e Zeta) com base em sua sequência, localização ou função (Friedman, 2011; Zhou et al., 2013). As classes delta e epsilon são consideradas inseto específicas (Zou et al., 2016).

Com o objetivo de demonstrar o papel da GST na desintoxicação de compostos tóxicos das plantas e futuramente utilizar como estratégia de controle de insetos pragas, trabalhos com RNAi estudaram o silenciamento de genes *GST* em insetos. Lagartas de

terceiro ínstar de *H. armigera* alimentadas com plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* expressando dsRNA do gene *GST1* apresentaram redução significativa de sua expressão e dos níveis da enzima GST no mesêntero, após quatro dias de alimentação (Mao et al., 2007). Zhou et al. (2013) injetaram dsRNA de dois genes *GST* (*NIGSTe1* – subclasse epsilon e *NIGSTm2* – atividade microssomal) em ninfas de *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) e observaram redução da expressão desses dois genes, 24 e 48 h após a injeção de dsRNA. Os transcritos de *NIGSTe1* diminuíram 90% em 24 h e 80% em 48 h e os transcritos de *NIGSTm2* apresentaram uma redução de 60% a 24 h e 90% a 48 h. O silenciamento desses dois genes não resultou em aumento da mortalidade das ninfas, mas observou-se que as ninfas tratadas com dsRNAs dos dois genes *GST* apresentaram maior sensibilidade ao inseticida organofosforado clorpirifós. Houve aumento da mortalidade das ninfas do quarto ínstar em 60% e 30% em resposta ao inseticida quando *NIGSTe1* e *NIGSTm2* foram silenciados, respectivamente. Esse estudo forneceu evidências de envolvimento dos genes *GST* da subclasse Epsilon e *GSTs* microssomal na tolerância de *N. lugens* ao inseticida clorpirifós. A função de *gluthatione S-transferase epsilon1* (*SIGSTe1*) de *Spodoptera litura* na detoxificação de compostos tóxicos presentes nas folhas de *Brassicaceae juncea* foi comprovada pela injeção de dsRNA *SIGSTe1* em lagartas de quinto ínstar (Zou et al., 2016). Após 24 h da microinjeção, foi constatada redução da expressão do gene *SIGSTe1* e as lagartas reduziram o peso larval.

As Carboxilesterases são enzimas envolvidas em detoxificação alimentar e de compostos xenobióticos em insetos. Elas são consideradas enzimas detoxificantes da fase I, que hidrolisam principalmente ésteres de ácidos carboxílicos e desempenham um papel na resistência de insetos a inseticidas, como dos grupos químicos dos organofosforados, carbamatos e piretróides (Zhang et al., 2013; Heckel, 2014; Xie et al., 2017). Esse mecanismo ocorre por meio da regulação positiva de mRNA do gene *carboxylesterase* e substituição de aminoácidos (Xie et al., 2017). Turner et al. (2006) alimentaram lagartas de *Epiphyas postvittana* de terceiro ínstar com solução aquosa de 10% sacarose contendo de 1 µg de dsRNA de *EposCXE1*, e foi verificada a redução significativa dos transcritos de *EposCXE1* 7 dias após a ingestão da solução, evidenciando o silenciamento do gene *carboxylesterase 1*. A injeção de dsRNA referentes a dois genes *carboxylesterases* (*LmCesA1* e *LmCesA2*) expressos em *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) reduziu o acúmulo de transcritos de *LmCesA1* (87% após 24 h e 86% após 48 h de injeção de dsRNA) e de *LmCesA2* (97% após 24 h de injeção de dsRNA). Além disso, a susceptibilidade das ninfas de *L. migratoria* ao inseticida clorpirifós aumentou de 34,2% para 55,1% quando *LmCesA1* foi silenciado, e de

34,2% para 48,7% quando *LmCesA2* foi silenciado, demonstrando o papel desses genes na detoxificação deste inseticida (Zhang et al., 2013). O silenciamento do gene *carboxylesterase* (*CarE*) demonstrou a relação desse gene na detoxificação do inseticida organofosforado (*omethoate*) em *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphidae) (Gong et al., 2014). Pulgões *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) que se alimentaram de plantas de trigo geneticamente modificadas para expressarem dsRNA do gene *carboxylesterase* (*CbEE4*) apresentaram redução na expressão do gene *CbEE4* quando comparada com àqueles que se alimentaram de plantas não transformadas (Xu et al., 2014). Verificou-se também diminuição significativa da enzima *CbEE4* quando os pulgões eram alimentados com plantas expressando dsRNA *CbEE4* e pulverizadas com o inseticida organofosforado Phoxim em relação a quando eram alimentados em plantas não transformadas e pulverizadas com Phoxim, demonstrando a relação da carboxilesterase na detoxificação de inseticidas.

O grupo das *alkaline phosphatase* (AP) é representado por proteínas presentes nas células do mesêntero dos insetos, responsáveis pelo transporte de outras proteínas para o interior da membrana peritrófica (Eguchi, 1995). As APs estão principalmente localizadas em microvilosidades das células colunares e epiteliais do mesêntero dos insetos, sendo relacionadas à absorção ativa dos metabólitos e dos processos de transporte, bem como participam de adesão celular (Yang et al., 2011). As APs podem ser agrupadas em solúveis ou ligadas à membrana, sendo que ambos os grupos são encontrados em células do epitélio do mesêntero larval (Itoh et al., 1991; Itoh et al., 1999; Yang et al., 2011). Considera-se que as APs de membrana estão envolvidas na digestão e na absorção de nutrientes, enquanto as APs solúveis podem desempenhar um papel na regulação do equilíbrio iônico. Trabalhos com RNAi tem sido realizados para elucidar o papel dessa proteína no transporte de proteínas tóxicas aos insetos, como as proteínas *Cry* (Zhao et al., 2016, Yuan et al., 2017). Com a redução da expressão do gene *alkaline phosphatase* (*ALP4*) por meio de RNAi, lagartas de *H. armigera* diminuíram a susceptibilidade a proteína *Cry2Aa* (Zhao et al., 2016). Foi observada menor taxa de mortalidade em lagartas de *Spodoptera exigua* em que fora silenciado o gene da *alkaline phosphatase* (*ALP2*) e tratadas com a proteína *Cry2Aa* (Yuan et al., 2017).

Nos insetos, o crescimento, desenvolvimento, metamorfose e reprodução são controlados pelo balanço entre o hormônio juvenil, produzido pelo *corpus allatum*, e o ecdisônio, sintetizado pela glândula protorácica (Klowden, 2007; Riddiford, 2012). O hormônio juvenil (JH) é um hormônio único para os insetos, embora seu precursor imediato, o farnesoato de metilo, seja encontrado nos Crustáceos, mediando a reprodução em algumas espécies (Nagaraju, 2011). O JH é um sesquiterpeno acíclico que regula o desenvolvimento

dos insetos, determinando suas transições metamórficas durante a passagem entre os instares (Kontogiannatos et al., 2016). A enzima *juvenile hormone acid methyltransferase* possui função importante na biossíntese do JH (Shinoda e Itoyama, 2003; Griebler et al., 2008).

Para insetos holometábolos, um dos pontos principais na regulação do título do JH é a transformação entre o último estágio larval para a fase pupa, quando o JH deve possuir baixa titulação (Campbell, 2001). Isso se dá por meio da combinação da redução da síntese de JH e da ação das enzimas de degradação do JH. A degradação do JH é um mecanismo importante, onde há a regulação do título de JH, com grande atuação das enzimas *juvenile hormone esterase* e *juvenile hormone epoxide hydrolase* (Kontogiannatos et al., 2016).

Todos os efeitos do JH são iniciados pelo transporte desse hormônio na hemolinfa aos tecidos alvos, realizado pela proteína de ligação *JH-binding protein* (JHBP). A formação do complexo JHBP fornece proteção ao JH quimicamente lábil contra a degradação enzimática e/ ou sequestro. A regulação dos títulos de JH é, portanto, crítica em toda a vida do inseto (Suzuki et al., 2011).

Para os ecdisteróides, sua síntese depende de fonte exógena de esterol proveniente da dieta, que normalmente requer desalquilação e uma série de etapas de hidroxilação, catalisadas por enzimas citocromo P450, codificadas pelo grupo dos genes *Halloween* (*phantom*, *disembodied*, *shadow* e *shade*) (Klowden, 2007; de Loof, 2008). Devido a grande importância que o sistema de regulação hormonal desempenha nos insetos, diversos trabalhos utilizaram o mecanismo de RNAi para silenciar genes envolvidos nas rotas de síntese desses hormônios (Tabela 2), seja para fins de estudos de função gênica, seja para desenvolver novas estratégias de controle de insetos mediadas por RNAi (Asokan et al., 2014; Yang e Han, 2014b; Ni et al., 2017). Minakuchi et al. (2009) demonstraram a função do gene *JH-inducible Krüppel* homolog 1 (*Kr-h1*) na regulação hormonal do JH e do ecdisônio em larvas de *Tribolium castaneum* utilizando silenciamento por RNAi. Larvas de *T. castaneum* microinjetadas com dsRNA *Kr-h1* apresentaram metamorfose precoce para a fase de pupa, permanecendo presas ao antigo tegumento.

Tabela 2. Lista de genes envolvidos nas rotas de síntese utilizados em estudos de silenciamento com RNAi, com a respectiva espécie de inseto estudada.

Gene alvo	Espécie	Efeito	Referência
<i>Halloween (spook, phantom)</i>	<i>Schistocerca gregaria</i>	Diminuição da expressão gênica	Marchal et al. (2011)
gene <i>Halloween (disembodied)</i>	<i>Sogatella furcifera</i>	Diminuição da expressão gênica e mortalidade de ninfas	Wan et al. (2014)
<i>juvenile hormone acid methyltransferase (JHAMT)</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	Diminuição do peso de lagartas e pupas e redução da viabilidade larval	Asokan et al. (2014)
<i>juvenile hormone acid methyltransferase (JHAMT)</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	Mortalidade de lagartas	Yang e Han, (2014b)
<i>juvenile hormone binding protein (JHBP)</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	Mortalidade de lagartas	Ni et al. (2017)
<i>juvenile hormone acid methyltransferase (JHAMT)</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	Mortalidade de lagartas	Ni et al. (2017)

2.4. Uso da técnica de RNA de interferência (RNAi) como método de controle de insetos pragas agrícolas

O uso de plantas geneticamente modificadas expressando dsRNA para controle de insetos-pragas foi demonstrado pela primeira vez nos trabalhos de Baum et al. (2007) e Mao et al. (2007). Baum et al. (2007) demonstraram o silenciamento gênico por RNAi por meio de desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas de milho expressando dsRNA do gene da ATPase vacuolar (*V-ATPase*). As plantas transgênicas de milho expressando dsRNA *V-ATPase* apresentaram menor dano causado por larvas de *D. virgifera* do que as não

transgênicas. Mao et al. (2007) desenvolveram plantas transgênicas de tabaco expressando dsRNA do gene alvo *citocromo monooxygenase* P450 (*CYP6AE14*) da lagarta *H. armigera*. A inibição da expressão de *CYP6AE14* por meio do mecanismo de RNAi levou à sua maior sensibilidade ao gossipol, composto de defesa natural produzido pelas plantas de algodão.

Desde então, plantas geneticamente modificadas de diversas espécies foram desenvolvidas para avaliar o efeito sobre insetos-pragas *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) (Thakur et al., 2014; Malik et al., 2016); *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) (Pitino et al., 2011; Pitino e Hogenhout, 2013; Guo et al., 2014; Mao e Zeng, 2014; Coleman et al., 2015); *S. avenae* (Xu et al., 2014; Abdellatef et al., 2015).

O híbrido de milho geneticamente modificado SmartStax Pro®, que expressa dsRNA do gene *Snf7* (proteína vacuolar essencial) foi lançado no mercado norte-americano pela empresa Monsanto em 2017. Esta cultivar apresenta resistência à larvas do besouro *D. virgifera*, sendo o primeiro exemplo de uma planta resistente comercial que utiliza a técnica de RNAi para o controle de uma praga agrícola (Zhang et al., 2017).

Com o objetivo de melhorar a eficácia do silenciamento gênico em espécies de insetos-pragas que apresentam recalcitrância ao RNAi, uma metodologia alternativa para expressão de dsRNA foi desenvolvida baseado em plantas transplastômicas, com a transformação genética de cloroplastos de forma a ampliar a expressão de dsRNA e favorecer o precessamento do dsRNA em siRNA pelo inseto e não pela planta (Zhang et al., 2015a). Besouros da espécie *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) que se alimentaram de plantas de batata com cloroplastos transformados expressando dsRNA, apresentaram maior taxa de mortalidade e causaram menor dano às plantas, quando comparado às plantas transformadas via nuclear e plantas não transformadas. Essa maior eficiência de controle é atribuída a capacidade dos cloroplastos armazenarem o dsRNA pois não apresentam a enzima RNase III. Além disso, o dsRNA foi expresso somente em tecidos fotossintéticos e não nos tubérculos de batata, demonstrando assim a especificidade e segurança da técnica para organismos não alvo (Zhang et al., 2015a; 2017). A eficiência desta técnica de transformação de cloroplasto também foi demonstrada no controle de *H. armigera* em plantas de tabaco (Jin et al., 2015; Bally et al., 2016).

Outra abordagem como tática de controle de insetos pragas é a aplicação de dsRNA sintético em plantas, semelhante ao uso de um inseticida (Hunter et al., 2012; Yu et al., 2016). A aplicação foliar de dsRNA do gene *actin* apresentou atividade no controle de *L. decemlineata* em plantas de batata por pelo menos 28 dias em condições de casa de vegetação e mostrou que o dsRNA não era prontamente removido por água, uma vez seco nas folhas

(San Miguel e Scott 2015). No entanto, a aplicação foliar não teria efeito sobre insetos-pragas sugadores, pois se alimentam do floema. Li et al. (2015) demonstraram que as raízes das plantas arroz absorvem dsRNA. A taxa de mortalidade aumentou significativamente quando ninfas da cigarrinha *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae) alimentaram-se de plantas irrigadas com uma solução contendo dsRNA do gene P450 - *CYP18A1* e *carboxylesterase*. Estes resultados indicam que a aplicação foliar e/ou irrigação da raiz de dsRNA podem ser utilizadas como alternativa na aplicação de dsRNA, atuando com um tipo de bioinsecticida para o manejo de insetos.

Novas abordagens estão surgindo como meio de disponibilizar o dsRNA para insetos-pragas, tais como a aplicação de nanopartículas de quitosana/dsRNA sobre plantas (Gong et al., 2013) e transformando microorganismos que co-existem naturalmente com insetos (Whitten et al., 2016; Murphy et al., 2016) e plantas (endofíticos).

2.5. *Tuta absoluta*

A traça-do-tomateiro foi originalmente descrita em 1917 por Meyrick como *Phthorimaea absoluta*, baseado em indivíduos coletados em Huancayo, Peru. O gênero foi sucessivamente alterado para *Gnorimoschema* (1962), *Scrobipalpula* (1964) e *Scrobipalpuloides* (1987), sendo, por último, nomeada taxonomicamente como *Tuta absoluta* (Povolny, 1994). Esta espécie pertence à ordem Lepidoptera, subordem Ditrysia, superfamília Gelechioidea, família Gelechiidae e subfamília Gelechiinae (Michereff Filho et al., 2013).

O ciclo de vida deste inseto compreende quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 3 A, B, C e D). Os adultos de *T. absoluta* são mariposas pequenas (10-11 mm de comprimento), coloração cinza-prateada, antenas filiformes e palpos labiais recurvados (Coelho e França, 1987; Haji et al., 1988). Possuem comportamento crepuscular-noturno-auroral, permanecendo na face inferior da folha do tomateiro durante o dia (Coelho e França, 1987; Souza e Reis, 1992). Os insetos são multivoltinos e a duração do ciclo de vida é dependente das condições ambientais, apresentando valores de 76, 40 e 23 dias a 14°C, 20°C e 27°C, respectivamente (Barrientos et al., 1998; Ferreira, 2011). As fêmeas ovipositam individualmente ao longo das nervuras dos folíolos, tanto na superfície superior como inferior, nos brotos terminais, nas hastes, no cálice das flores e nos frutos do tomateiro (Coelho e França, 1987; Uchoa-Fernandes et al., 1995; Souza e Reis, 2000; EPPO, 2005; Desneux et al., 2010).

Os ovos são elípticos, amarelos e pequenos (0,36 mm x 0,22 mm) (Figura 3 A). As lagartas eclodem dos ovos e penetram nos tecidos mais tenros e minam os folíolos, broqueiam o caule, perfuram as brotações apicais, atacam os frutos (depreciando-os para a comercialização) e, em casos extremos, podem matar as plantas (Figura 3 E, F) (Michereff Filho et al., 2013). As lagartas apresentam o corpo com coloração que varia do verde-claro à rosa, com uma placa quitinosa escura na parte dorsal do primeiro segmento torácico (Figura 3 B). O estágio larval apresenta quatro estádios, e a duração e viabilidade larval são influenciadas pela temperatura na qual as lagartas se desenvolvem, sendo retardada em baixas temperaturas (Quiroz, 1976; Imenes et al. 1990) e acelerada em altas temperaturas (Souza e Reis, 1992; Giustolin et al., 2002); porém a fase larval dura em média em torno de 13 a 15 dias (Michereff Filho et al., 2013).

As pupas são obtectas, possuem coloração marrom-amarelada e são envoltas por um casulo de seda esbranquiçado (Ferreira, 2011). São encontradas frequentemente nos folíolos e no caule do tomateiro, podendo ocorrer também no interior dos frutos ou ainda no solo, como pupa nua (Coelho e França, 1987; Souza e Reis, 1992; EPPO, 2005). É na fase de pupa que normalmente se faz a separação dos sexos, sendo que nas fêmeas o cremaster se invagina, formando dois lóbulos e no macho ele dá origem ao orifício anal (Ferreira, 2011). O poro genital no macho localiza-se no 9º segmento abdominal e na fêmea está entre o 8º e o 9º segmentos (Coelho e França, 1987). A fase de pupa dura em média sete dias (Giustolin e Vendramin, 1996; Bogorni e Carvalho, 2006) e geralmente com viabilidade de 80% à temperatura de 25°C (Coelho e França, 1987; Giustolin e Vendramin, 1994). Em baixas temperaturas há um prolongamento da fase de pupa, que pode se estender por até dezenove dias (Quiroz, 1976). A longevidade dos adultos varia entre sexos, sendo que as fêmeas vivem mais que os machos; porém, em média, os adultos vivem cerca de 10 dias, sendo a longevidade variável de acordo com a temperatura, tipo de alimento na fase larval e sexo (Coelho e França, 1987; Haji et al., 1988; Giustolin e Vendramin, 1996; Ferreira, 2011). No campo, as gerações da traça são sobrepostas, podendo ocorrer em uma lavoura infestada, todos os estágios da praga ao mesmo tempo (Souza e Reis, 1992).

Atualmente, este inseto é considerado uma das principais pragas da cultura do tomateiro, sendo este o seu hospedeiro preferencial e no qual sua importância como praga é maior. Porém, pode atacar as folhas de outras solanáceas cultivadas, tais como a batata (*Solanum tuberosum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), pimentão (*Capsicum annum* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e pepino doce (melão andino, cachum ou xachum) (*Solanum muricatum*). Pode atacar também solanáceas silvestres do gênero *Solanum*, *Datura*

e *Nicotiana*, (Cifuentes et al., 2011), como a maria-pretinha (*Solanum americanum* Mill.), joá-bravo (*Solanum aculeatissimum* Jacq.), entre outras, que apresentam potencial de manter e permitir a dispersão regional das populações da praga durante a entressafra do tomate (França et al., 1992). Na Europa foram reportadas outras espécies de plantas como hospedeiras alternativas dessa praga: fisális (*Physalis peruviana* L.; Solanaceae) (Tropea Garzia, 2009); *Lycium* sp. (Solanaceae) e *Malva* sp. (Malvaceae) (Caponero, 2009), e em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.; Fabaceae) (EPPO, 2009; Cifuentes et al., 2011; Ferracini et al., 2012).

Tuta absoluta tem origem Neotropical, e esteve restrita a América do Sul até 2006, quando foi introduzida na Europa. Desde a sua primeira detecção na Espanha, este inseto-praga se espalhou rapidamente pelo continente e pelo Mediterrâneo (Desneux et al., 2011). Introduções em novas regiões parecem ser de alguma forma ligadas à importação de frutos de tomate, com casos confirmados em outros países da Europa (Reino Unido, Países Baixos, Rússia e Lituânia). Por outro lado, dados de amostragem com armadilhas de feromônio indicam que *T. absoluta* possui uma capacidade de dispersão ativa (Desneux et al., 2011). Este inseto foi encontrado até o final de 2012 nos seguintes países: Albânia, Arábia Saudita, Argélia, Bahrain, Bósnia-Herzegovina, Bulgária, Chipre, Croácia, Dinamarca, Etiópia, Egito, Espanha, França, Alemanha, Grécia, Hungria, Iêmen, Israel, Iraque, Itália, Jordânia, Kosovo, Líbia, Malta, Marrocos, Países Baixos, Portugal, Reino Unido, Romênia, Rússia (Krasnodar), Sérvia, Síria, Sudão, Suíça, Tunísia e Turquia (Buhl et al., 2010; Cîuljak et al., 2010; Desneux et al. 2010; Duric e Hrnica 2010; Erler et al., 2010; Keresi et al., 2010; Kilic, 2010; Ostrauskas e Ivinskis, 2010; Seplyarsky et al., 2010; Izhevsky et al., 2011, Desneux et al., 2011). Em 2013, a introdução de *T. absoluta* foi confirmada no Irã, Kuwait, Paquistão (*Tuta absoluta* Distribution, 2013), Senegal (Pfeiffer et al., 2013) e em 2017 em Burkina Faso (Son et al., 2017), demonstrando sua alta capacidade de dispersão no mundo (Figura 4).

Tuta absoluta tem sido relatada como uma praga devastadora, que pode causar perdas de 80-100% se medidas de controle não forem empregadas (Desneux et al., 2010; Pfeiffer et al., 2013). Para reduzir os danos do inseto, os inseticidas constituem a estratégia de controle mais utilizada, inclusive nos países de recente introdução (Desneux et al., 2010; Haddi et al., 2012). Porém, a possibilidade de infestação de diversas partes da planta, o comportamento de permanecer dentro do fruto e a falta de inimigos naturais em decorrência de ser uma praga exótica em países de recente introdução, dificultam as ações de manejo desta praga. Assim, novas estratégias de controle se fazem necessárias, visto os casos de populações resistentes a inseticidas relatados (Siqueira et al., 2000; Siqueira et al., 2001; Campos et al., 2014; Silva et al., 2011; Haddi et al. 2012; Gontijo et al. 2012; Roudakis et al.,

2015; Silva et al., 2016), bem como os efeitos secundários dos pesticidas sobre artrópodes benéficos (Arnó e Gabarra 2011; Biondi et al., 2012; Desneux et al., 2007).

Embora existam diversas táticas de manejo utilizadas contra *T. absoluta*, como controle cultural, varietal e biológico, o uso de inseticidas ainda é o método de controle mais utilizado, inclusive nos países de recente introdução (Desneux et al., 2010; Guedes e Picanço, 2012; Haddi et al., 2012). Porém, o hábito minador das lagartas faz com que esta praga seja um alvo difícil de ser atingido, havendo falhas no controle e, conseqüentemente, estimulando o aumento no número de aplicações com inseticidas elevando os custos financeiros e ambientais (Benvença et al., 2007; Guedes e Picanço, 2012). Além disso, diversas populações brasileiras de *T. absoluta* apresentam resistência a moléculas inseticidas utilizadas para seu controle, como abamectina (Siqueira et al., 2001), cloridrato de cartape (Siqueira et al., 2000), metamidofós (Siqueira et al., 2000), permetrina (Siqueira et al., 2000), espinosade (Campos et al., 2014), teflubenzurom e triflumurom (Silva et al., 2011). Recentemente foram relatadas populações de *T. absoluta* resistentes a moléculas da classe das diamidas, novo grupo de inseticidas muito utilizado no controle de lepidópteros (Roditakis et al., 2015; Silva et al., 2016). Neste sentido, novas estratégias integradas ao controle químico são almejadas para reduzir o número de pulverizações, o aparecimento de populações resistentes e os problemas de contaminação ambiental e de saúde humana.

Figura 3. Fases de desenvolvimento de *Tuta absoluta* e danos das lagartas em folhas e frutos de tomateiro. A - ovos de *T. absoluta* (Fonte: EPPO, 2017a); B - lagarta de *T. absoluta* (Fonte: EPPO, 2017a); C - pupa de *T. absoluta* (Fonte: Son et al., 2017); D - adulto de *T. absoluta* (Fonte: Son et al., 2017); E - danos de lagartas de *T. absoluta* em folhas de tomateiro (Fonte: Bento, F.M.M.); F - danos de lagartas de *T. absoluta* em frutos de tomate (Fonte: Bento, F.M.M.).

Figura 4. Mapa de distribuição de *Tuta absoluta* no mundo e nos estados do Brasil. Legenda: regiões do mapa coloridas em laranja indicam presença confirmada de *T. absoluta*; regiões do mapa coloridas em roxo indicam relato não confirmado de *T. absoluta*; regiões do mapa em branco indicam ausência de casos reportados (EPPO, 2017b).

Referências

- Abdellatef, E.; Will, T.; Koch, A.; Imani, J.; Vilcinskas, A.; Kogel, K. Silencing the expression of the salivary sheath protein causes transgenerational feeding suppression in the aphid *Sitobion avenae*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, p. 849–857, 2015.
- Arakane, Y.; Muthukrishnan, S.; Kramer, K.J.; Specht, C.A.; Tomoyasu, Y.; Lorenzen, M.D.; Kanost, M.; Beeman, R.W. The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. **Insect Molecular Biology**, v. 14, p. 453-463, 2005.
- Arnó, J.; Gabarra, R. Side effects of selected insecticides on the *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) predators *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae). **Journal of Pest Science**, v. 84, p. 513-520, 2011.
- Aronstein, K.; Oppert, B.; Lorenzen, M.D. RNAi in Agriculturally-Important Arthropods. In: **RNA Processing**. GRABOWSKI, P. (Ed.). InTech, p. 157-180, 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/rna-processing/rnai-in-agriculturally-important-arthropods>. Acesso em 15 de maio 2014.
- Asokan, R.; Sharath Chandra, G.; Manamohan, M.; Krishna Kumar, N.K.; Sita, T. Response of various target genes to diet-delivered dsRNA mediated RNA interference in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Journal of Pest Science**, v. 87, p. 163-172, 2014.
- Bally, J.; McIntyre, G.J.; Doran, R.L.; Lee, K.; Perez, A.; Jung, H.; Naim, F.; Larrinua, I.M.; Narva, K.E.; Waterhouse, P.M. In-Plant Protection against *Helicoverpa armigera* by production of long hpRNA in chloroplasts. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1453, 2016.
- Barrientos, Z.R.; Apablaza, H.J.; Norero, S.A.; Estay, P.P. Threshold temperature and thermal constant for development of the South American tomato moth, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Ciencia e Investigacion Agraria**, v.25, p.133-137, 1998.
- Baum, J.A.; Bogaert, T.; Clinton, W.; Heck, G.R.; Feldmann, P.; Ilagan, O.; Johnson, S.; Plaetinck, G.; Munyikwa, T.; Pleau, M.; Vaughn, T.; Roberts, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1322-1326, 2007.
- Bautista, M.A.M.; Miyata, T.; Miura, K.; Tanaka, T. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 38-46, 2009.
- Beck, M.; Strand, M.R. *Glc1.8* from *Microplitis demolitor* bracovirus induces a loss of adhesion and phagocytosis in insect high five and S2 cells. **Journal of Virology**, v. 79, p. 1861–1870, 2005.
- Bellés, X. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 111-128, 2010.

Benvenega, S.R.; Fernandes, O.A.; Gravena, S. Tomada de decisão de controle da traça-do-tomateiro através de armadilhas com feromônio sexual. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 164-169, 2007.

Berezikov, E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. **Nature Reviews Genetic**, v. 12, p. 846-860, 2011.

Bettencourt, R.; Terenius, O.; Faye, I. Hemolin gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia* pupae is lethal to next generation embryos. **Insect Molecular Biology**, v. 11, p. 267-271, 2002.

Biondi, A.; Mommaerts, V.; Smagghe, G.; Viñuela, E.; Zappalà, L.; Desneux, N. The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1523-1536, 2012.

Bogorni, P.C.; Carvalho, G.S. Biologia de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em diferentes cultivares de *Lycopersicon esculentum* Mill. **Bioikos**, v.20, p. 49-61, 2006.

Buhl, O.; Falck, P.; Karsholt, O.; Larsen, K.; Vilhelmsen, F. Records of microlepidoptera from Denmark in 2009 (Lepidoptera). **Entomologiske Meddelelser**, v. 78, p. 101–116, 2010.

Burand, J.P.; Hunter, W.B. RNAi: future in insect management. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112 , p. S68-S74, 2013.

Camargo, R.A.; Herai, R.H.; Santos, L.N., Bento, F.M.M.; Lima, J.E.; Marques-Souza, H.; Figueira, A. De Novo transcriptome assembly and analysis to potential gene targets for RNAi-mediated control of the tomato leafminer (*Tuta absoluta*). **BMC Genomics**, v.16. p.1-17, 2015.

Campbell, P.M.; Harcourt, R.L.; Crone, E.J.; Claudianos, C.; Hammock, B.D.; Russell, R.J.; Oakeshott, J.G. Identification of a juvenile hormone esterase gene by matching its peptide mass fingerprint with a sequence from the *Drosophila* genome project. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 31, p. 513–520, 2001.

Campos, M.R.; Rodrigues, A.R.S.; Silva, W.M.; Silva, T.B.M.; Silva, V.R.F.; Guedes, R.N.C.; Siqueira, H.A.A. Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: a bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. **Plos One**, v. 9, e103235, 2014.

Caponero, A. Solanacee, rischio in serre. Resta alta l'attenzione alla tignola del pomodoro nelle colture protette. **Colture Protette**, v. 10, p. 96–97, 2009.

Carthew, R.; Sontheimer, E. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, p. 642-655, 2009.

Chen, X.; Tian, H.; Zou, L.; Tang, B.; Hu, J.; Zhang, W. Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. **Bulletin of Entomological Research**, v. 98, p. 613-619, 2008.

Cifuentes, D.; Chynoweth, R.; Bielza, P. Genetic study of mediterranean and south american populations of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Povolny, 1994) (Lepidoptera: Gelechiidae) using ribosomal and mitochondrial markers. **Pest Management Science**, v. 67, p. 1155-1162, 2011.

Ciûljak, T.G.; Razov, J.; Gomboc, S.; Grubisic, D.; Juran, I.; Zianic, K. The first record of tomato leaf miner *Tuta absoluta* Povolny, 1994 (Lepidoptera: Gelechiidae) in Croatia. **Glasilo Biljne Zastite**, v.10, p.273–281, 2010.

Clemens, J.C.; Worby, C.A.; Simonson-Leff, N.; Muda, M.; Maehama, T.; Hemmings, B.A.; Dixon, J.E. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America*, v. 97, p. 6499–6503, 2000.

Coelho, M.C.F.; França, F.H. Biologia, quetotaxia da larva e descrição da pupa e adulto da traça-do-tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, p. 129-135, 1987.

Coleman, A.D.; Wouters, R.H.M.; Mugford, S.T.; Hogenhout, S.A. Persistence and transgenerational effect of plant-mediated RNAi in aphids. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, p. 541–548, 2015.

Desneux, N.; Decourtye, A.; Delpuech, J.M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 81-106, 2007.

Desneux, N.; Wajnberg, E.; Wyckhuys, K.A.G.; Burgio, G.; Arpaia, S.; Narváez-Vasquez, C.A.; González-Cabrera, J.; Ruescas, D.C.; Tabone, E.; Frandon, J.; Pizzol, J.; Poncet, C.; Cabello, T.; Urbaneja, A. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. **Journal of Pest Science**, v. 83, p. 197-215, 2010.

Desneux, N.; Luna, M.G.; Guillemaud, T.; Urbaneja, A. The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. **Journal of Pest Science**, v. 84, p. 403-408, 2011.

Ding, S.W. RNA-based antiviral immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 632-644, 2010.

Duric, Z.; Hrnica, S. Tomato leaf miner - *Tuta absoluta* Meyrick in the Republic of Srpska. **Agroznanje**, v. 11, p. 17-23, 2010.

Eguchi, M. Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 111, p. 151-162, 1995.

EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. **Data sheets on quarantine pests. *Tuta absoluta***. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, v. 35, p. 434–435, 2005.

EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization, **EPPO Reporting Service** N° 8. 2009. Disponível em: <http://archives.eppo.org/EPPORreporting/2009/Rse-0908.pdf>.

EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. **Global Database: *Tuta absoluta* photos**. 2017a. Disponível em <https://gd.eppo.int/taxon/GNORAB/photos>. Acesso em 10 de setembro de 2017.

EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. **Global Database: *Tuta absoluta* distribution**. 2017b. Disponível em <https://gd.eppo.int/taxon/GNORAB/distribution>. Acesso em 10 de setembro de 2017.

Erlor, F.; Can, M.; Erdogan, M.; Ates, A.O.; Pradier, T. New record of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) on greenhouse-grown tomato in southwestern Turkey (Antalya). **Journal of Entomological Science**, v. 45, p. 392-393, 2010.

Fabrick, J.A.; Kanost, M.R.; Baker, J.E. RNAi-induced silencing of embryonic tryptophan oxygenase in the pyralid moth, *Plodia interpunctella*. **Journal of Insect Science**, v. 4, p. 1-9, 2004.

Ferracini, C.; Ingegno, B.L.; Navone, P.; Ferrari, E.; Mosti, M.; Tavelta, L.; Alma, A. Adaptation of indigenous larval parasitoids to *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Italy. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, p. 1311-1319, 2012.

Ferreira, F.T.R. **Bioatividade de nanoformulações de nim e extratos de outras Meliaceae e a sua interação com agentes de controle biológico visando ao controle de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)**. 2011. 176 p. Tese (Doutorado em Ciências: Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

Fishilevich, E.; Vélez, A.M.; Storer, N.P.; Li, H.; Bowling, A.J.; Rangasamy, M.; Worden, S.E.; Narva, K.E.; Siegfried, B.D. RNAi as a management tool for the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. **Pest Management Science**, v. 72, p. 1652–1663, 2016.

França, F.H.; Castelo Branco, M. Ocorrência da traça-do-tomateiro (*Scrobipalpus absoluta*) em solanáceas silvestres no Brasil Central. **Horticultura Brasileira**, v. 10, p. 6-10, 1992.

Friedman, R. Genomic organization of the glutathione S-transferase family in insects. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 61, p. 924–932, 2011.

Galdeano, D.M.; Breton, M.C.; Lopes, J.R.S.; Falk, B.W.; Machado, M.A. Oral delivery of double-stranded RNAs induces mortality in nymphs and adults of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Plos One**, v. 12, e0171847, 2017.

Ganbaatar, O.; Cao, B.; Zhang, Y.; Bao, D.; Bao, W.; Wuriyangan, H. Knockdown of *Mythimna separata* chitinase genes via bacterial expression and oral delivery of RNAi effectors. **BMC Biotechnology**, v.17, p.1-11, 2017.

Garbutt, J.S.; Bellés, X.; Richards, E.H.; Reynolds, S.E. Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymphs a potential determiner of RNA interference success: evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, p. 171–178, 2013.

Giustolin, T.A.; Vendramin, J.D. Efeito de duas espécies de tomateiro na biologia de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 23, p. 511-517, 1994.

Giustolin, T.A.; Vendramin, J.D. Efeito dos aleloquímicos 2-tridecanona e 2-undecanona na biologia de *Tuta absoluta* (Meyrick). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, p. 417-422, 1996.

Giustolin, T.A.; Vendramin, J.D.; Parra, J.R.P. Número de instares larvais de *Tuta absoluta* (Meyrick) em genótipos de tomateiro. **Scientia Agricola**, v. 59, p. 593-596, 2002.

Gong, L.; Chen, Y.; Hu, Z.; Hu, M. Testing insecticidal activity of novel chemically synthesized siRNA against *Plutella xylostella* under laboratory and field conditions. **Plos One**, v. 8, e62990, 2013.

Gong, Y.H.; Yu, X.R.; Shang, Q.L.; Shi, X.Y.; Gao, X.W. Oral delivery mediated RNA interference of a carboxylesterase gene results in reduced resistance to organophosphorus insecticides in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. **Plos One**, v. 9, e102823, 2014.

Gontijo, P.C.; Picanço, M.C.; Pereira, E.J.G.; Martins, J.C.; Chediak, M.; Guedes, R.N.C. Spatial and temporal variation in the control failure likelihood of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*. **Annals of Applied Biology**, v. 162, p. 50-59, 2012.

Gordon, K. H.J.; Waterhouse, P.M. RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1231-1232, 2007.

Griebler, M.; Westerlund, S.A.; Hoffmann, K.H.; Meyering-Vos, M. RNA interference with the allatoregulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p. 997–1007, 2008.

Guedes, R.N.C.; Picanço, M.C. The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. **EPPO Bulletin**, v. 42, p. 211–216, 2012.

Guo, H.; Song, X.; Wang, G.; Yang, K.; Wang, Y.; Niu, L.; Chen, X.; Fang, R. Plant-generated artificial small RNAs mediated aphid resistance. **Plos One**, v. 9, e97410, 2014.

Haddi, K.; Berger, M.; Bielza, P.; Cifuentes, D.; Field, L.M.; Gorman, K.; Rapisarda C.; Williamson, M.S.; Bass, C. Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the voltage-gated sodium channel of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, p. 506-513, 2012.

Haji, F.N.P.; Parra, J.R.P.; Silva, J.P.; Batista, J.S. Biologia da traça do tomateiro sob condições de laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 23, p. 107-110, 1988.

Heckel, D.G. Insect detoxification and sequestration strategies. **Annual Plant Reviews**, v. 47, p. 77–114, 2014.

Hegedus, D.; Erlandson, M.; Gillott, C.; Toprak, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 285–302, 2009.

Hirai, M.; Terenius, O.; Faye, I. Baculovirus and dsRNA induce hemolin, but no antibacterial activity, in *Antheraea pernyi*. **Insect Molecular Biology**, v. 13, p. 399–405, 2004.

Huang, Y.F.; Xu, Z.B.; Lin, X.Y.; Feng, Q.L.; Zheng, S.C. Structure and expression of glutathione S-transferase genes from the midgut of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Noctuidae) and their response to xenobiotic compounds and bacteria. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 1033–1044, 2011.

Hunter, W.B.; Glick, E. Paldi, N.; Bextine, B.R. Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression. **Southwestern Entomologist**, v. 37, p. 85–87, 2012.

Huvenne, H.; Smagghe, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 227–235, 2010.

Imenes, S.D.L.; Uchoa-Fernandes, M.A.; Campos, T.B.; Takematsu, A.P. Aspectos biológicos e comportamentais da traça do tomateiro *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick, 1917), (Lepidoptera - Gelechiidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 57, p. 63–68, 1990.

Israni, B.; Rajam, M.V. Silencing of ecdysone receptor, insect intestinal mucin and sericotropin genes by bacterially produced double-stranded RNA affects larval growth and development in *Plutella xylostella* and *Helicoverpa armigera*. **Insect Molecular Biology**, v. 26, p. 164–180, 2017.

Itoh, M.; Takeda, S.; Yamamoto, H.; Izumi, S.; Tomino, S.; Eguchi, M. Cloning and sequencing analysis of membrane-bound alkaline phosphatase cDNA of the silkworm, *Bombyx mori*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1129, p. 135–138, 1991.

Itoh, M.; Kanamori, Y.; Takao, M.; Eguchi, M. Cloning of soluble alkaline phosphatase cDNA and molecular basis of the polymorphic nature in alkaline phosphatase isozymes of *Bombyx mori* midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 121–129, 1999.

Izhevsky, S.S.; Akhatov, A.K.; Sinyov, S.Y. *Tuta absoluta* has been detected in Russia. **Zashchita Karantin Rast**, v. 3, p. 40–44, 2011.

Jin, S.; Singh, N.D.; Li, L.; Zhang, X.; Daniell, H. Engineered chloroplast dsRNA silences cytochrome p450 monooxygenase, V-ATPase and chitin synthase genes in the insect gut and disrupts *Helicoverpa armigera* larval development and pupation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, p. 435–446, 2015.

Joga, M.R.; Zotti, M.J.; Smagghe, G.; Christiaens, O. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. 553, 14p, 2016.

Johnson, J.A.; Bitra, K.; Zhang, S.; Wang, L.; Lynn, D.E.; Strand, M.R. The UGA-CiE1 cell line from *Chrysodeixis includens* exhibits characteristics of granulocytes and is permissive to infection by two viruses. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 394–404, 2010.

Kelkenberg, M.; Odman-Naresh, J.; Muthukrishnan, S.; Merzendorfer, H. Chitin is a necessary component to maintain the barrier function of the peritrophic matrix in the insect midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 56, p. 21–28, 2015.

Keresi, T.; Ivanovic, M.; Tolic, D. Tomato moth (*Tuta absoluta* Povolny) - new potential threat to tomato production in Serbia. **Biljn Lek**, v. 38, p. 474–484, 2010.

Ketting, R. The many faces of RNAi. **Developmental Cell**, v. 20, p. 148–161, 2011.

Khajuria, C.; Buschman, L.L.; Chen, M.S.; Muthukrishnan, S.; Zhu, K.Y. A gut specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 621–629, 2010.

Kilic, T. First record of *Tuta absoluta* in Turkey. **Phytoparasitica**, v. 38, p. 243–244, 2010.

Klowden, M.J. Endocrine systems. In: Klowden M.J. (Ed). **Physiological systems in insects**. 2nd ed. Burlington, MA: Academic, 2007. p. 1–49.

Kontogiannatos, D.; Swevers, L.; Kourti, A. Recent gene multiplication and evolution of a juvenile hormone esterase-related gene in a lepidopteran pest. **Gene Reports**, v. 4, p. 139–152, 2016.

Kramer, K.J.; Muthukrishnan, S. Chitin metabolism in insects. In: Gilbert, L.I.; Iatrou, K.; Gill, S.S. (Eds.). **Comprehensive Molecular Insect Science**, Elsevier: Oxford, vol. 4. 2005. p. 111–144.

Lamontagne, B.; Larose, S.; Boulanger, J.; Elela, S.A. The RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 3, p. 71–78, 2001.

Lehane, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 525–550, 1997.

Li, X.; Schuler, M.A.; Berenbaum, M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 231–253, 2007.

Li, H.; Guan, R.; Guo, H.; Miao, X. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. **Plant, Cell e Environment**, v. 38, p. 2277–2285, 2015.

Liu, W.; Yang, F.; Jia, S.; Miao, X.; Huang, Y. Cloning and characterization of Bmrunt from the silkworm *Bombyx mori* during embryonic development. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 69, p. 47–59, 2008.

de Loof, A. Ecdysteroids, juvenile hormone and insect neuropeptides: recent successes and remaining major challenges. **General and Comparative Endocrinology**, v. 155, p. 3-13. 2008.

Luo, Y.; Wang, X.; Yu, D.; Kang, L. The SID-1 double-stranded RNA transporter is not required for systemic RNAi in the migratory locust. **RNA Biology**, v. 9, p. 663-671, 2012.

Maia, I.G. Histórico. In: **Introdução à técnica de Interferência por RNA-RNAi**. Pereira, T.C. (Coord.). Sociedade Brasileira de Genética: Ribeirão Preto, Ed. Cubo, 2013. Cap. 1. p.1-14.

Malik, H.J.; Raza, A.; Amin, I.; Scheffler, J.A.; Scheffler, B.E.; Brown, J.K.; Mansoor, S. RNAi-mediated mortality of the whitefly through transgenic expression of double-stranded RNA homologous to acetylcholinesterase and ecdysone receptor in tobacco plants. **Scientific Reports**, v. 6, n. 38469, 2016.

Mao, Y.B.; Cai, W.J.; Wang, J.W.; Hong, G.J.; Tao, X.Y.; Wang, L.J.; Huang, Y.P.; Chen, X.Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1307-1313, 2007.

Mao, W.; Rupasinghe, S.G.; Johnson, R.M.; Zangerl, A.R.; Schuler, M.A.; Berenbaum, M.R. Quercetin-metabolizing CYP6AS enzymes of the pollinator *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 154, p. 427-434, 2009.

Mao, Y.B.; Tao, X.Y.; Xue, X.Y.; Wang, L.J.; Chen, X.Y. Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. **Transgenic Research**, v. 20, p. 665-673, 2011.

Mao, J.; Zeng, F. Plant-mediated RNAi of a gap gene-enhanced tobacco tolerance against the *Myzus persicae*. **Transgenic Research**, v. 23, p. 145-152, 2014.

March, J.C.; Bentley, W.E. RNAi-based tuning of cell cycling in *Drosophila* S2 cells-effects on recombinant protein yield. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 1128-113, 2007.

Marchal, E.; Badisco, L.; Verlinden, H.; Vandersmissen, T.; Van Soest, S.; Van Mielendaele, P.; Broeck, J.V. Role of the Halloween genes, Spook and Phantom in ecdysteroidogenesis in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 1240-1248, 2011.

Martin, D.; Maestro, O.; Cruz, J.; Mané-Padrós, D.; Belles, X. RNAi studies reveal a conserved role for RXR in molting in the cockroach *Blattella germanica*. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, p. 410-416, 2006.

Masumoto, M.; Yaginuma, T.; Niimi, T. Functional analysis of Ultrabithorax in the silkworm, *Bombyx mori*, using RNAi. **Development Genes and Evolution**, v. 219, p. 437-444, 2009.

McEwan, D.L.; Weisman, A.S.; Hunter, C.P. Uptake of extracellular double-stranded RNA by SID-2. **Molecular Cell**, v. 47, p. 746-754, 2012.

Mello, C.C.; Conte, D. Revealing the world of RNA interference. **Nature**, v. 431, p. 338-342, 2004.

Merzendorfer, H. Insect chitin synthases: a review. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 176, p. 1-15, 2006.

Michereff Filho, M.; Guimarães, J.A.; Moura, A.P. **A traça do tomateiro no mundo**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2013. 31 p.

Minakuchi, C.; Namiki, T.; Shinoda, T. Krüppel homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Developmental Biology**, v. 325, p. 341-350, 2009.

Murphy, K.A.; Tabuloc, C.A.; Cervantes, K.R.; Chiu, J.C. Ingestion of genetically modified yeast symbiont reduces fitness of an insect pest via RNA interference. **Scientific Reports**, v. 6, n. 22587, 2016.

Nagaraju, G.P.C. Reproductive regulators in decapod crustaceans: an overview. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, p. 3-16, 2011.

Ni, M.; Ma, W.; Wang, X.; Gao, M.; Dai, Y.; Wei, X.; Zhang, L.; Peng, Y.; Chen, S.; Ding, L.; Tian, Y.; Li, J.; Wang, H.; Wang, X.; Xu, G.; Guo, W.; Yang, Y.; Wu, Y.; Heuberger, S.; Tabashnik, B.E.; Zhang, T.; Zhu, Z. Next-generation transgenic cotton: pyramiding RNAi and Bt counters insect resistance. **Plant Biotechnology Journal**, p. 1-10, 2017.

Niu, G.; Rupasinghe, S.G.; Zangerl, A.R.; Siegel, J.P.; Schuler, M.A.; Berenbaum, M.R. A substrate-specific cytochrome P450 monooxygenase, CYP6AB11, from the polyphagous navel orangeworm (*Amyelois transitella*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, p. 244-253, 2011.

Ostrauskas, H.; Ivinskis, P. Records of the tomato pinworm (*Tuta absoluta*, Meyrick 1917) - Lepidoptera: Gelechiidae - in Lithuania. **Acta Zoologica Lituanica**, v. 20, p. 151-155, 2010.

Pan, M.H.; Wang, X.Y.; Chai, C.L.; Zhang, C.D.; Lu, C.; Xiang, Z.H. Identification and function of Abdominal-A in the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Molecular Biology**, v. 18, p. 155-160, 2009.

Perrimon, N.; Ni, J.Q.; Perkins, L. *In vivo* RNAi: today and tomorrow. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2; p. 1-11, 2010.

Pfeiffer, D.G.; Muniappan, R.; Sall, D.; Diatta, P.; Diongue, A.; Dieng, E.O. First record of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Senegal. **Florida Entomologist**, v. 96, p. 661-662, 2013.

Pitino, M.; Coleman, A.D.; Maffei, M.E.; Ridout, C.J.; Hogenhout, S.A. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. **Plos One**, v. 6, e25709, 2011.

Pitino, M.; Hogenhout, S.A. Aphid protein effectors promote aphid colonization in a plant species-specific manner. **Molecular Plant and Microbe Interactions**, v. 26, p. 130-139, 2013.

Povolny, D. Gnorimoschemine of South America VI: identification keys checklist of Neotropical taxa and general consideration (Insecta, Lepidoptera, Gelechiidae). **Steenstrupia**, v.20, p.1-42, 1994.

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

Quan, G.X., Kanda, T.; Tamura, T. Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm white gene. **Insect Molecular Biology**, v. 11, p. 217-222, 2002.

Quiroz, E.C. Nuevos antecedentes sobre la biología de la polilla del tomate, *Scrobipalpa absoluta* (Meyrick). **Agricultura Técnica**, v. 36, p. 82-86, 1976.

Riddiford, L.M. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? **General and Comparative Endocrinology**, v. 179, p. 477-484, 2012.

Roditakis, E.; Vasakis, E.; Grispou, M.; Stavrakaki, M.; Nauen, R.; Gravouil, M.; Bassi, A. First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. **Journal of Pest Science**, v. 88, p. 9-16, 2015.

Rodrigues, T.B.; Figueira, A. Management of insect pest by RNAi: a new tool for crop protection.. In: Abdurakhmonov, I. (Ed.). **RNA Interference**. 1ed. InTech: Rijeka, 2016. Cap. 18, p. 371-390.

Rodrigues, T.B.; Rieske, L.K.; Duan, J.J.; Mogilicherla, K.; Palli, S.R. Development of RNAi method for screening candidate genes to control emerald ash borer, *Agrilus planipennis*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 7379, 2017.

Roignant, J.Y.; Carre, C.; Mugat, B.; Szymczak, D.; Lepesant, J.A.; Antoniewski, C. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. **RNA**, v. 9, p. 299-308, 2003.

Rupasinghe, S.G.; Wen, Z.; Chiu, T.L.; Schuler, M.A. *Helicoverpa zea* CYP6B8 and CYP321A1: different molecular solutions to the problem of metabolizing plant toxins and insecticides. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 20, pp. 615-624, 2007.

San Miguel, K.; Scott, J.G. The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. **Pest Management Science**, v. 38, p. 2277-2285, 2015.

Sasabe, M.; Wen, Z.; Berenbaum, M.R.; Schuler, M.A. Molecular analysis of CYP321A1, a novel cytochrome P450 involved in metabolism of plant allelochemicals (furanocoumarins) and insecticides (cypermethrin) in *Helicoverpa zea*. **Gene**, v. 338, p. 163-175, 2004.

Scott, J.G., Michel, K., Bartholomay, L.C., Siegfried, B.D., Hunter, W.B., Smagghe, G., Zhu, K.Y., Douglas, A.E. Towards the elements of successful Insect RNAi. **Journal of Insect Physiology**, v.59, p. 1212-1221, 2013.

Seplyarsky, V.; Weiss, M.; Haberman, A. *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae), a new invasive species in Israel. **Phytoparasitica**, v. 38, p. 445-446, 2010.

Shah, C.; Forstemann, K. Monitoring miRNA-mediated silencing in *Drosophila melanogaster* S2-cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1779, p. 766-772, 2008.

Shi, J.; Mu, L.; Chen, X.; Guo, W.; Li, G. RNA interference of chitin synthase genes inhibits chitin biosynthesis and affects larval performance in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **International Journal of Biological Sciences**, v. 12, p. 1319-1331, 2016.

Shinoda, T.; Itoyama, K. Juvenile hormone acid methyltransferase: a key regulatory enzyme for insect metamorphosis. **Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 100, p. 11986-11991, 2003.

Silva, C.P.; Silva, J.R.; Vasconcelos, F.F.; Petretski, M.D.; Damatta, R.A.; Ribeiro, A. F., Terra, W. Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. **Arthropod Structure and Development**, v. 33, p. 139–148, 2004.

Silva, G.A.; Picanço, M.C.; Bacci, L.; Crespo, A.L.B.; Rosado, J.F.; Guedes, R.N.C. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science**, v. 67, p. 913-920, 2011.

Silva, J.E.; Assis, C.P.O; Ribeiro, L.M.S.; Siqueira, H.A.A. Field-evolved resistance and cross-resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) populations to diamide insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 109, p. 2190-2195, 2016.

Siqueira, H.A.A.; Guedes, R.N.C.; Picanço, M.C. Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Agricultural and Forest Entomology**, v. 2, p. 147-153, 2000.

Siqueira, H.A.A.; Guedes, R.N.C.; Fragoso, D.B.; Magalhães, L.C. Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **International Journal of Pest Management**, v. 47, p. 247-251, 2001.

Sivakumar, S.; Rajagopal, R.; Venkatesh, G.R.; Srivastava, A.; Bhatnagar, R.K. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 7312-7319, 2007.

Snyder, M.J.; Stevens, J.L.; Andersen, J.F.; Feyereisen, R. Expression of cytochrome P450 genes of the CYP4 family in midgut and fatbody of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 321, p. 13–20, 1995.

Son, D.; Bonzi, S.; Somda, I.; Bawin, T.; Boukraa, S.; Verheggen, F.; Francis, F.; Legreve, A.; Schiffers, B. First Record of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Burkina Faso. **African Entomology**, v. 25, p. 259-263, 2017.

Souza, J.C.; Reis, P.R. **Traça do tomateiro**: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos e controle. Belo Horizonte: EPAMIG, 1992. 20p. (Boletim Técnico, 38).

Souza, J.C.; Reis, P.R. **Traça do tomateiro**: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos e controle. Belo Horizonte: EPAMIG, 2000. 32 p. (EPAMIG. Boletim Técnico, 57).

Suzuki, R.; Fujimoto, Z.; Shiotsuki, T.; Tsuchiya, W.; Momma, M.; Tase, A.; Miyazawa, M.; Yamazaki, T. Structural mechanism of JH delivery in hemolymph by JHBP of silkworm, *Bombyx mori*. **Scientific Reports**, v. 1, n. 133, 2011.

Terenius, O.; Papanicolaou, A.; Garbutt, J.S.; Eleftherianos, I.; Huvenne, H.; Kanginakudru, S.; Albrechtsen, M.; An, C.; Aymeric, J.L.; Barthel, A.; Bebas, P.; Bitra, K.; Bravo, A.; Chevalier, F.; Collinge, D.P.; Crava, C.M.; Maagd, R.A.; Duvic, B.; Erlandson, M.; Faye, I.; Felföldi, G.; Fujiwara, H.; Futahashi, R.; Gandhe, A.S.; Gatehouse, H.S.; Gatehouse, L.N.; Giebultowicz, J.M.; Gómez, I.; Grimmelikhuijzen, C.J.P.; Groot, A.T.; Hauser, F.; Heckel, D.G.; Hegedus, D.D.; Hrycaj, S.; Huang, L.; Hull, J.J.; Iatrou, K.; Iga, M.; Kanost, M.R.; Kotwica, J.; Li, C.; Li, J.; Liu, J.; Lundmark, M.; Matsumoto, S.; Meyering-Vos, M.; Millichap, P.J.; Monteiro, A.; Mrinal, N.; Niimi, T.; Nowara, D.; Ohnishi, A.; Oostra, V.; Ozaki, K.; Papakonstantinou, M.; Popadic, A.; Rajam, M.V.; Saenko, S.; Simpson, R.M.; Soberón, M.; Strand, M.R.; Tomita, S.; Toprak, U.; Wang, P.; Wee, C.W.; Whyard, S.; Zhang, W.; Nagaraju, J.; Ffrench-Constant, R.H.; Herrero, S.; Gordon, K.; Swevers, L.; Smagghe, G. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 231-245, 2011.

Thakur, N.; Upadhyay, S.K.; Verma, P.C.; Chandrashekar, K.; Tuli, R.; Singh, P.K. Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase A Gene. **Plos One**, v. 9, e87235, 2014.

Tian, H.; Peng, H.; Yao, Q.; Chen, H.; Xie, Q.; Tang, B.; Zhang, W. Developmental control of a Lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacterial expressing dsRNA of a non-midgut gene. **Plos One**, v. 4, e6225, 2009.

Tomita, S.; Kikuchi, A. Abd-B suppresses lepidopteran proleg development in posterior abdomen. **Developmental Biology**, v. 328, p. 403-409, 2009.

Tomoyasu, Y.; Miller, S.C.; Tomita, S.; Schoppmeier, M.; Grossmann, D.; Bucher, G. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. **Genome Biology**, v. 9, n. 10, 2008.

Tropea Garzia, G. *Physalis peruviana* L. (Solanaceae), a host plant of *Tuta absoluta* in Italy. **IOBC/WPRS Bulletin**, v. 49, p. 231-232, 2009.

Tsuzuki, S.; Sekiguchi, S.; Kamimura, M.; Kiuchi, M.; Hayakawa, Y. A cytokine secreted from the suboesophageal body is essential for morphogenesis of the insect head. **Mechanisms of Development**, v. 122, p. 189-197, 2005.

Turner, C.T.; Davy, M.W.; Macdiarmid, R.M.; Plummer, K.M.; Birch, N.P. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. **Insect Molecular Biology**, v. 15, p. 383-391, 2006.

Tuta absoluta Distribution. ***Tuta absoluta* information network**. Disponível em: www.tutaabsoluta.com. 2017. Acesso em 20 de agosto de 2017.

Uchoa-Fernandes, M.A.; Della Lucia, T.M.C.; Vilela, E.F. Mating, oviposition and pupation of *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyer.) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 159-164, 1995.

Upadhyay, S.K.; Chandrashekar, K.; Thakur, N.; Verma, P.C.; Borgio, J.F.; Singh, P.K.; Tuli, T. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. **Journal of Biosciences**, v. 36, p. 153-161, 2011.

Vogel, H.; Musser, R.O.; Celorio-Mancera, M.P. Transcriptome responses in herbivorous insects towards host plant and toxin feeding. **Annual Plant Reviews**, v. 47, p. 197-234, 2014.

Wan, P.J.; Jia, S.; Li, N.; Fan, J.M.; Li, G.Q. RNA Interference depletion of the Halloween gene *Disembodied* implies its potential application for management of planthopper *Sogatella furcifera* and *Laodelphax striatellus*. **Plos One**, v. 9, e86675, 2014.

Wang, Y.; Zhang, H.; Li, H.; Miao, X. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. **Plos One**, v. 6, e18644, 2011.

Wang, H.; Gong, L.; Qi, J.; Hu, M.; Zhong, G.; Gong, L. Molecular cloning and characterization of a SID-1-like gene in *Plutella xylostella*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 87, p. 164-176, 2014.

Wang, K.; Peng, Y.; Pu, J.; Fu, W.; Wang, J.; Han, Z. Variation in RNAi efficacy among insect species is attribute able to dsRNA degradation *in vivo*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 77, p. 1-9, 2016.

Wen, Z.; Pan, L.; Berenbaum, M.R.; Schuler, M.A. Metabolism of linear and angular furanocoumarins by *Papilio polyxenes* CYP6B1 coexpressed with NADPH cytochrome P450 reductase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 937-947, 2003.

Wen, Z.; Rupasinghe, S.; Niu, G.; Berenbaum, M.R.; Schuler, M.A. CYP6B1 and CYP6B3 of the black swallowtail (*Papilio polyxenes*): adaptive evolution through subfunctionalization. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, p. 2434-2443, 2006.

Whangbo, J.S.; Hunter, C.P. Environmental RNA interference. **Trends in Genetics**, v. 24, p. 297-305, 2008.

Whitten, W.M.A.; Facey, P.D.; Del Sol, R.; Fernandez-Martinez, L.; Evans, M.C.; Mitchell, J.J.; Bodger, O.G.; Dyson, P.J. Symbiont-mediated RNA interference in insects. **Proceeding of the Royal Society B**, v. 283, n. 20160042, 2016.

Whyard, S.; Singh, A.D.; Wong, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species specific insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 824-832, 2009.

Xie, M.; Ren, N.; You, Y.; Chen, W.; Song, Q.; You, M. Molecular characterisation of two α -esterase genes involving chlorpyrifos detoxification in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Pest Management Science**, v. 73, p. 1204-1212, 2017.

Xu, J.; Mon, H.; Kusakabe, T.; Li, Z.; Zhu, L.; Iiyama, K.; Masuda, A.; Mitsudome, T.; Lee, J.M. Establishment of a soaking RNA interference and *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV)-hypersensitive cell line using Bme21 cell. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 10435-10444, 2013.

Xu, L.; Duan, X.; Lv, Y.; Zhang, X.; Nie, Z.; Xie, C.; Ni, Z.; Liang, R. Silencing of an aphid carboxylesterase gene by use of plant-mediated RNAi impairs *Sitobion avenae* tolerance of Phoxim insecticides. **Transgenic Research**, v. 23, p. 389–396, 2014.

Xu, J.; Wang, X.F.; Chen, P.; Liu, F.T.; Zheng, S.C.; Ye, H.; Mo, M.H. RNA Interference in Moths: Mechanisms, Applications, and Progress. **Genes**, v. 7, n. 88, 2016.

Xue, X.Y.; Mao, Y.B.; Tao, X.Y.; Huang, Y.P.; Chen, X.Y. New approaches to agricultural insect pest control based on RNA interference. **Advances in Insect Physiology**, v. 42, p. 73-117, 2012.

Yang, Y.L.; Zhu, Y.C.; Ottea, J.; Husseneder, C.; Leonard, B.R.; Abel, C.; Huang, F. Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis* susceptible and -resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 592-603, 2010.

Yang, Y.; Zhu, Y.C.; Ottea, J.; Husseneder, C.; Leonard, B.R.; Abel, C.; Luttrell, R.; Huang, F. Down regulation of a gene for cadherin, but not alkaline phosphatase, associated with Cry1Ab resistance in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. **PloS One**, v. 6, e25783, 2011.

Yang, J.; Han, Z. Efficiency of different methods for dsRNA delivery in Cotton Bollworm (*Helicoverpa armigera*). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, p. 115-123, 2014a.

Yang, J.; Han, Z. Optimisation of RNA interference-mediated gene silencing in *Helicoverpa armigera*. **Australian Entomology**, v. 53, p. 83-88, 2014b.

Yokoi, K.; Kamezaki, M.; Yoshida, T.; Tanaka, T.; Miura, K. Sensitivity to RNA interference-mediated gene silencing in intact and ligated larvae of the armyworm, *Mythimna separate* (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 48, p. 431-439, 2013.

You, M.; Yue, Z.; He, W.; Yang, X.; Yang, G.; Xie, M.; Zhan, D.; Baxter, S.W.; Vasseur, L.; Gurr, G.M.; Douglas, C.J.; Bai, J.; Wang, P.; Cui, K.; Huang, S.; Li, X.; Zhou, Q.; Wu, Z.; Chen, Q.; Liu, C.; Wang, B.; Li, X.; Xu, X.; Lu, C.; Hu, M.; Davey, J.W.; Smith, S.M.; Chen, M.; Xia, X.; Tang, W.; Ke, F.; Zheng, D.; Hu, Y.; Song, F.; You, Y.; Ma, X.; Peng, L.; Zheng, Y.; Liang, Y.; Chen, Y.; Yu, L.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Li, G.; Fang, L.; Li, J.; Zhou, X.; Luo, Y.; Gou, C.; Wang, J.; Wang, J.; Yang, H.; Wang, J. A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. **Nature Genetics**, v. 45, p. 220-225, 2013.

Yu, X.; Jones, H.D.; Sun, Y.; Wang, G.; Xia, L. Cross-species silencing: plant-mediated RNAi for insect control. Cap. 12, p. 151-164. In: Jones H.D. (Ed). **Biotechnology of Major Cereals**. CAB International, 2016. 230p.

Yuan, X.; Zhao, M.; Wei, J.; Zhang, W.; Wang, B.; Khaing, M.M.; Liang, G. New insights on the role of alkaline phosphatase 2 from *Spodoptera exigua* (Hübner) in the action mechanism of Bt toxin Cry2Aa. **Journal of Insect Physiology**, v. 98, p. 101–107, 2017.

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

Zhang, X.; Liu, X.; Ma, J.; Zhao, J. Silencing of cytochrome P450 CYP6B6 gene of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) by RNAi. **Bulletin of Entomological Research**, v.103, p. 584–591, 2013.

Zhang, J.; Khan, S.A.; Hasse, C.; Ruf, S.; Heckel, D.G.; Bock, R. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. **Science**, v. 347, p. 991–994, 2015a.

Zhang, X.; Mysore, K.; Flannery, E.; Michel, K.; Severson, D.W.; Zhu, K.Y.; Duman-Scheel, M. Chitosan/interfering RNA nanoparticle mediated gene silencing in disease vector mosquito larvae. **Journal of Visualized Experiments**, v. 97, e52523, 2015b.

Zhang, J.; Khan, S.A.; Heckel, D.G.; Bock, R. Next-Generation Insect-Resistant Plants: RNAi-Mediated Crop Protection. **Trends in Biotechnology**, v. 35, p. 871-882, 2017.

Zhao, M.; Yuan, X.; Wei, J.; Zhang, W.; Wang, B.; Khaing, M.M.; Liang, G. Functional roles of cadherin, aminopeptidase-N and alkaline phosphatase from *Helicoverpa armigera* (Hübner) in the action mechanism of *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa. **Scientific Reports**, v. 7, n. 46555, 2016.

Zhou, W.; Liang, Q.; Xu, Y.; Gurr, G.M.; Bao, Y.; Zhou, X.; Zhang, C.; Cheng, J.; Zhu, Z. Genomic insights into the glutathione s-transferase gene family of two rice planthoppers, *Nilaparvata lugens* (Stål) and *Sogatella furcifera* (Horváth) (Hemiptera: Delphacidae). **Plos One**, v. 8, e56604, 2013.

Zhu, K.Y. RNA interference: A powerful tool in entomological research and a novel approach for insect pest management. **Insect Science**, v. 20, p. 1-3, 2013.

Zhu, K.Y.; Merzendorfer, H.; Zhang, W.; Zhang, J.; Muthukrishnan, S. Biosynthesis, turnover, and functions of chitin in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 61, p. 177-196, 2016.

Zhuang, J.J.; Hunter, C.P. RNA interference in *Caenorhabditis elegans*: uptake, mechanism, and regulation. **Parasitology**, v. 139, p. 560-573, 2012.

Zotti, M.J.; Smagghe, G. RNAi technology for insect management and protection of beneficial insects from diseases: lessons, challenges and risk assessments. **Neotropical Entomology**, v. 44, p. 197-213, 2015.

Zou, X.; Xu, Z.; Zou, H.; Liu, J.; Chen, S.; Feng, Q.; Zheng, S. Glutathione S-transferase SIGSTE1 in *Spodoptera litura* may be associated with feeding adaptation of host plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 70, p. 32-43, 2016.

3. SILENCIAMENTO GÊNICO DE *Tuta absoluta* por RNA DE INTERFERÊNCIA

RESUMO

Tuta absoluta (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), conhecido popularmente como “traça-do-tomateiro”, é um dos principais insetos-praga na cultura do tomateiro no mundo, sendo necessária a adoção de táticas de controle para seu manejo. A técnica de RNA de interferência (RNAi) surge como uma nova abordagem no controle de insetos-praga com potencial uso no controle de *T. absoluta*. Para desenvolver um sistema de RNAi que seja aplicável como estratégia de controle de insetos-pragas é necessário inicialmente desenvolver uma metodologia robusta de *screening* de genes alvos de silenciamento que garanta a entrega de dsRNA de maneira eficiente e que permita a avaliação dos efeitos do silenciamento gênico sobre o desenvolvimento do inseto alvo. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo a busca por uma metodologia de fornecimento de dsRNA a lagartas de *T. absoluta* eficiente, que permitisse avaliação do silenciamento de um maior número de genes alvos e que facilitasse a avaliação dos efeitos do silenciamento sobre o desenvolvimento do inseto. Essa foi baseada na alimentação de lagartas de *T. absoluta* com dieta artificial acrescida de *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA dos genes alvos. Foram escolhidos e avaliados oito genes de *T. absoluta*: *juvenile hormone inducible protein* – *JHP*; *juvenile hormone epoxide hydrolase protein* – *JHEH*; *ecdysteroid 25-hydroxylase* – *PHM*; *chitin synthase A* – *CHI*; *glutathione S-transferase epsilon 2* – *GST*; *carboxylesterase* – *COE*; *alkaline phosphatase* – *AP* e; *arginine kinase* – *AK*. Por meio de avaliação dos parâmetros biológicos (mortalidade larval, duração da fase larval e peso de pupas) e expressão gênica em cinco períodos de alimentação, comprovou-se a eficiência da metodologia na avaliação do silenciamento gênico por RNAi, sendo possível realizar *screening* de grande quantidade de genes e avaliar os efeitos do silenciamento gênico no desenvolvimento de *T. absoluta*. Os genes *AK*, *CHI* e *JHP* apresentaram resultados positivos quanto ao silenciamento gênico e mortalidade larval, sendo promissores para uso de silenciamento por RNAi como estratégia de controle de lagartas de *T. absoluta*.

Palavras-chave: RNAi; Traça-do-tomateiro; Silenciamento gênico pós-transcricional; Dupla fita de RNA

ABSTRACT

Tuta absoluta (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), commonly known as tomato leafminer, is one of the main insect pests in tomato crop worldwide, requiring the adoption of control tactics for its management. The RNA interference technique (RNAi) is a new approach in the control of insect pests with potential use to control *T. absoluta*. In order to develop an RNAi system applicable to an insect pest control strategy, it is necessary to develop a robust screening methodology for silencing target genes that guarantees the delivery of dsRNA in an efficient way, allowing the evaluation of effects of gene silencing on the development of the insect. The objective of this work was to search for an efficient methodology to deliver dsRNA to *T. absoluta* larvae, that would allow the evaluation of the silencing of a greater number of target genes, and to facilitate the evaluation of effects of gene silencing on insect development. This methodology was based on the feeding of *T. absoluta*

larvae with artificial diet, adding *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressing dsRNA of target genes. We evaluated eight genes of *T. absoluta*: juvenile hormone inducible protein - *JHP*; juvenile hormone epoxide hydrolase protein - *JHEH*; ecdysteroid 25-hydroxylase - *PHM*; chitin synthase A - *CHI*; glutathione S-transferase epsilon 2 - *GST*; carboxylesterase - *COE*; alkaline phosphatase - *AP* and; arginine kinase - *AK*. Evaluating biological parameters (larval mortality, larval phase duration and pupal weight) and gene expression in five feeding periods, we proved the efficiency of this methodology to evaluate gene silencing by RNAi, and its effects of gene silencing on the development of *T. absoluta*. The genes *AK*, *CHI* and *JHP* presented positive results regarding gene silencing and larval mortality, and are promising to be used in RNAi silencing as a strategy to control *T. absoluta* larvae.

Keywords: RNAi; Tomato leafminer; Post transcriptional gene silencing; Double-stranded RNA

3.1. Introdução

Tuta absoluta (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), conhecido popularmente como “traça-do-tomateiro”, é um dos principais insetos-praga na cultura do tomateiro no mundo (Michereff Filho et al., 2013; Desneux et al., 2011, Urbaneja et al., 2012, 2013). Os danos são produzidos pelas lagartas que se alimentam de todos os estágios de desenvolvimento da planta. Nas folhas, as lagartas se alimentam do parênquima foliar, fazendo galerias, diminuindo a área fotossintética da planta e, conseqüentemente, a produção. Podem consumir tecidos do caule, brotos e frutos, sendo neste último o dano maior, por causar danos diretos (pela alimentação) e indiretos (aberturas podem ser porta de entrada para microorganismos) (Cifuentes et al., 2011, Urbaneja et al., 2013).

Embora existam diferentes táticas de controle utilizadas para *T. absoluta*, como controle cultural, varietal e biológico, o uso de inseticidas ainda é o método de controle mais utilizado (Guedes e Picanço, 2012). Porém, ações de controle são dificultadas pelo hábito da lagarta de se alimentar fazendo galerias em folhas, caules e frutos, ficando assim protegida do contato e ação de inseticidas e inimigos naturais. Devido às falhas de controle, há um aumento no número de pulverizações com inseticidas, contribuindo para a pressão de seleção de resistência nas populações de *T. absoluta*, causando também efeitos secundários dos inseticidas sobre artrópodes benéficos e ao meio ambiente (Arnó e Gabarra, 2011; Biondi et al., 2012; Desneux et al., 2007). Dessa maneira, novas estratégias de controle são necessárias.

A técnica de RNA de interferência (RNAi) é apontada como tecnologia potencial para o manejo de insetos pragas em campo (Gordon e Waterhouse, 2007; Price e Gatehouse, 2008; Huvenne e Smagghe, 2010; Xue et al., 2012; Zotti e Smagghe, 2015) desde os trabalhos pioneiros da aplicação da técnica de RNAi por ingestão a partir da expressão de dsRNA em

plantas transgênicas. Baum et al. (2007) e Mao et al. (2007) demonstraram que a ingestão de dsRNA de um gene alvo do inseto-praga produzido por planta transgênia resultou em silenciamento gênico, prejuízo ao desenvolvimento do inseto e redução de danos. Desde então, a abordagem de RNAi foi avaliada para diversos insetos-pragas oferecendo dsRNA via alimentação, seja por meio de dsRNA sintetizado *in vitro*, por bactérias que expressem dsRNA e plantas transgênicas, com o objetivo de analisar os efeitos de diversos genes alvos na mortalidade e no desenvolvimento. Um milho híbrido geneticamente modificado para controle de *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), desenvolvido pela empresa Monsanto e lançada no mercado norte americano, é o primeiro exemplo de uma planta transgênica comercial que utiliza a técnica de RNAi para o controle de uma praga agrícola (Zhang et al., 2017).

A escolha do gene alvo de silenciamento é um ponto crítico que deve ser considerado para a eficiência da técnica, pois o efeito é variável em razão da espécie e do papel do gene na fisiologia e desenvolvimento do inseto. Porém, o grande desafio para otimizar a escolha do gene é uma metodologia de entrega de dsRNA eficiente, que garanta a estabilidade da molécula até atingir o mRNA alvo de silenciamento no inseto e que seja próxima das condições reais de fornecimento de dsRNA para uso como tática de controle em campo (Pereira, 2013; Yu et al., 2013; Rodrigues e Figueira, 2016).

A resposta e a estabilidade da molécula de dsRNA no inseto é variável em razão da Ordem. Os insetos da Ordem Lepidoptera são conhecidos por apresentarem recalcitrância ao silenciamento utilizando dsRNA exógeno (Terenius et al., 2011), possivelmente devido a ação de ribonucleases e fatores do ambiente do trato digestório e da hemolinfa dos insetos (Rodrigues e Figueira, 2016; Joga et al., 2016; Shukla et al., 2016; Zhang et al., 2017). Sendo assim, torna-se necessário o estabelecimento de métodos de entrega de dsRNA que mantenham a molécula estável até atingir as células alvos de silenciamento no inseto e que permitam a seleção de um maior número de genes alvos em lepidópteros. A entrega de dsRNA produzido por bactérias, como a *Escherichia coli* HT115 (DE3), tem se mostrado eficiente no silenciamento gênico em espécies de lepidópteros (Tian et al., 2009; Yang e Zhao, 2014; Ganbaatar et al., 2017).

Visando a aplicação da técnica de RNAi em *T. absoluta*, Camargo et al. (2015) realizaram uma análise de transcrito deste inseto, disponibilizando sequências gênicas. Neste trabalho, e também no de Camargo et al. (2016), alguns genes alvos de *T. absoluta* foram testados com uma metodologia baseada no uso de folíolos de tomateiros destacados das plantas, onde os pecíolos são imersos em solução com dsRNA sintetizado *in vitro* para a

absorção do dsRNA. Após a absorção, as lagartas foram dispostas sobre as folhas para alimentação. Com essa metodologia foi observado aumento da mortalidade de lagartas para os tratamentos de dsRNA dos genes *Vacuolar ATPase catalytic subunit A (V-ATPase)* e *Arginine kinase (AK)*. Apesar de essa metodologia ter apresentado resultados satisfatórios, ela apresenta obstáculos para o *screening* de grande quantidade de genes, dependência de plantas de tomateiro, além de não garantir a estabilidade da molécula de dsRNA até atingir o mRNA alvo. Somado a isso, *T. absoluta* pertence à Ordem Lepidoptera, que tem sido relatada na literatura como recalcitrante ao mecanismo do RNAi. Para este grupo de insetos, tem sido proposto métodos de entrega que protejam a molécula de dsRNA, como o uso de bactérias transformadas que expressem dsRNA, garantindo eficiência no teste de genes alvos, com baixa degradação de dsRNA. Uma dieta artificial para *T. absoluta* foi desenvolvida e avaliada como adequada para criação desse inseto em laboratório (Bajonero e Parra, 2017), o que favorece a experimentação com bactérias que expressem dsRNA de interesse, como *Escherichia coli* HT115 (DE3), para a entrega de RNAi por alimentação para *T. absoluta*.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi selecionar genes alvos de silenciamento, a partir de sequências disponíveis no transcrito de *T. absoluta* e avaliar o efeito do silenciamento desses em *T. absoluta*, utilizando o método de entrega de dsRNA que garantisse a estabilidade da molécula até atingir as células alvos de silenciamento no inseto.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Criação de *Tuta absoluta*

Os insetos utilizados foram provenientes da criação de *T. absoluta*, estabelecida no Laboratório de Biologia de Insetos, Departamento de Entomologia e Acarologia, ESALQ/USP. O inseto foi criado em dieta natural, seguindo metodologia adaptada de Bajonero e Parra (2017), na qual foram oferecidas plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cultivar “Santa Clara” para as lagartas recém-eclodidas. Estas foram mantidas em gaiolas de acrílico de 70 × 50 × 50 cm em uma sala climatizada a 25°C ± 2°C e fotofase de 14 h. As gaiolas foram verificadas diariamente para coleta de adultos recém-emergidos, sendo esses transferidos para outra gaiola destinada à cópula e postura. Foram disponibilizados folíolos de tomate no interior da gaiola com o objetivo de centralizar as posturas em um mesmo local e otimizar a coleta dos ovos. Os ovos nos folíolos foram coletados em tecido “voile” e colocados em placas de Petri. As placas foram armazenadas em câmaras

climatizadas com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14 h, até a eclosão das lagartas, as quais foram utilizadas nos experimentos.

3.2.2. Material vegetal

As plantas de tomateiro cultivar “Santa Clara” utilizadas para criação de *T. absoluta* foram cultivadas em vasos de plástico de 2 L com substrato para hortaliças e fertilizadas com fertilizante granulado NPK, na formulação de 4-14-8, dose de 8 g L^{-1} , juntamente com 4 g de calcário no momento de transplântio. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação do Laboratório de Biologia de Insetos, por aproximadamente 30 a 50 dias após o transplântio, ponto em que foram transferidas para gaiolas de criação de *T. absoluta* para alimentação das lagartas. Já as plantas de tomateiro utilizadas para os experimentos de fornecimento de dsRNA sintetizado *in vitro* foram cultivadas de maneira similar, porém foram mantidas em casa-de-vegetação do Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP).

3.2.3. Escolha dos genes alvos de silenciamento por RNA de interferência (RNAi)

Para selecionar os genes alvos para silenciamento, foi realizada análise do transcrito de *T. absoluta*, com base no trabalho de Camargo et al. (2015). Foram considerados critérios fundamentais no processo de silenciamento gênico, como: especificidade gênica, essencialidade, tamanho e região alvo do gene para desenho do dsRNA (Baum et al., 2007; Mao et al., 2007; Huvenne e Smagghe, 2010; Pereira, 2013; Yu et al., 2013; Rodrigues e Figueira, 2016). Em seguida foi realizada uma busca por meio da anotação no banco de dados “Blast2Go” (Conesa et al., 2005) e análise dos dados gerados pelo sequenciamento em larga escala “RNA-seq” do banco de dados de sequências (Camargo et al., 2015).

A identidade da sequência de nucleotídeos dos genes alvos escolhidos foi comparada no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e alinhados para identificação das regiões codificadoras de proteínas, utilizando o programa CLUSTAL W2 (Larkin et al., 2007). Estas regiões foram analisadas por meio do *software* SciTool RNAi Design (https://www.idtdna.com/site/order/designtool/index/DSIRNA_CUSTOM), identificando-se as regiões com maior probabilidade de gerar pequenos RNAs interferentes

(siRNAs) pelo corte da enzima DICER. Essas regiões foram utilizadas para desenho de iniciadores (*primers*) por meio do *software* Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000).

Nas regiões escolhidas para desenho de *primers* foi realizada uma análise de especificidade em organismos não alvos utilizando a rotina *Somewhat similar sequences (blastn)* do pacote *Nucleotide BLAST*, do NCBI (Evangelista et al., 2013). A análise foi realizada utilizando *database Reference RNA Sequences (REFSEQ_RNA)* para os organismos: *Homo sapiens*, *Solanum lycopersicum*, Ordem Insecta e sem identificar o organismo. Para o parâmetro *Max target sequences* foi utilizado 20.000, ou seja, o máximo de sequências que o programa permite. Nas análises de especificidade foi verificado se nas regiões alvos de clonagem de cada gene havia identidade de 100% com sequências de organismos não alvos, ou seja, se a busca do BLAST resultava em *hits* com um número igual ou maior que 21 nucleotídeos contínuos e idênticos de organismos não alvos (Evangelista et al., 2013).

3.2.4. Silenciamento utilizando dsRNA sintetizado *in vitro*

3.2.4.1. Extração de RNA de *T. absoluta* para síntese de cDNA

As atividades de biologia molecular foram realizadas no Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP. Para a clonagem dos genes candidatos, amostras de lagartas de cada um dos quatro ínstares de *T. absoluta* foram coletadas separadamente, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até a extração de RNA total. Cada amostra foi extraída separadamente a partir de cerca de 100 mg de material, utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Todas as soluções utilizadas para a extração de RNA foram preparadas com água 0,01% dietilpirocarbonato (DEPC) inativa (autoclavada). Para a determinação da concentração do RNA total extraído, uma alíquota de 2 µL foi submetida à leitura em fluorômetro Qubit 3.0 (QUBIT 3.0 Fluorometer -Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) e sua integridade foi examinada por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão SB (10 mM NaOH, pH 8,5, ajustado com ácido bórico) (Brody e Kern, 2004) a 3 Volts cm⁻¹, aplicando-se uma alíquota de 2 µL do RNA total de cada amostra.

3.2.4.2. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, foram adicionados ao tampão de reação com MgCl₂ da DNase I (Fermentas, Vilnius, Lituânia): 2 µg de RNA, 2 U de DNase I e 40 U de inibidor de RNase Ribolock (Fermentas). A mistura foi incubada a 37°C por 30 min em termociclador

Veriti (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA) e após este período, foi adicionado 1 μL de EDTA (50 mM) e a solução submetida a 10 min a 65°C para inativação da enzima. A seguir, a síntese de cDNA foi realizada utilizando RevertAid (Fermentas). Assim, 1 μg do RNA tratado, 250 μM de cada dNTP e 50 μM de Oligo dT foram submetidos a uma temperatura de 65°C por 5 min e resfriadas em gelo. Em seguida, foram adicionados 4 μL de tampão 5X RT Buffer (Fermentas), 20 U de Ribolock RNase Inhibitor (Fermentas) e 200 U da enzima *RevertAid Premium Reverse Transcriptase* (Fermentas) em um volume final de 20 μL . A reação foi incubada por 30 min a 50°C e depois por 5 min a 85°C, para inativação da enzima. Com as amostras de cDNA de cada ínstar foi feito um *mix* de cDNA com partes iguais de cada ínstar. O cDNA obtido foi diluído dez vezes para uso como solução de trabalho.

3.2.4.3. Amplificação e clonagem de genes candidatos em vetor pGEM-T *Easy*

Os genes alvos de *T. absoluta* foram amplificados a partir do *mix* de cDNA de ínstaes de lagartas (descrito em 3.2.4.2.), com o uso de pares de *primers* específicos contendo sequências complementares de cada gene alvo (Tabela 3). As reações de amplificações continham 25 ng do *mix* de cDNA de lagartas de todos os ínstaes, 1,5 mM MgCl_2 , 400 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada *primer* (Tabela 3), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas) em tampão $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, num volume final de 25 μL . A amplificação foi conduzida em termociclador, empregando as seguintes condições térmicas: 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 55 ciclos a 61,5°C (dependendo do gene) por 1 min e 72°C por 1 min, finalizando à 72°C por 2 min. Em seguida as amplificações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos de interesse foram recortados do gel com o auxílio de uma lâmina descartável e purificados utilizando-se o kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) de acordo com as especificações fornecidas pelo fabricante. Em seguida os fragmentos purificados foram clonados em vetor pGEM-T *Easy* (Promega Madison, WI, EUA). Para isso, cerca de 150 ng de DNA amplificado, purificado e quantificado em DyNA Quant 200 fluorometer (Hoefer; Holliston, MA, EUA) foram aliquotados em microtubo juntamente com tampão de ligação, 50 ng de vetor pGEM-T *Easy* e 5 U de T4 DNA ligase (Promega) e incubados a 4°C por 16 h em reações de 10 μL . Em seguida, 2 μL da reação foram utilizados para a transformação de *Escherichia coli* eletrocompetente, cepa TOP10, via eletroporação pelo MicroPulser Eletroporator Apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB (Meio Luria-Bertani - 10 g L^{-1} de Triptona; 5 g L^{-1} de Extrato de Levedura; 10 g L^{-1} de NaCl). As bactérias foram

cultivadas em meio LB contendo 100 mg L⁻¹ de ampicilina, 40 µg mL⁻¹ de X-Gal e 0,1 mM de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) para seleção das bactérias transformantes.

As bactérias positivas para a transformação foram inoculadas em meio LB líquido contendo 100 mg L⁻¹ de ampicilina e a presença do inserto foi confirmada pela extração do DNA plasmidial por lise alcalina, seguida de análise por digestão com *EcoRI* para liberação do inserto. Cerca de 400 ng do plasmídeo contendo o inserto foram digeridos em reações de 10 µL contendo tampão da enzima e 10 U de *EcoRI* por 4 h a 37°C, e a presença do inserto foi confirmada pela amplificação do fragmento via PCR. Para confirmação de identidade do gene de interesse, os plasmídeos foram sequenciados por sequenciador 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento continham oligo T7 ou SP6, e foram conduzidas sob as seguintes condições de reação: 35 ciclos de 95°C por 15 s, 50°C por 15 s e 60°C por 2 min. Foram sequenciados três clones de cada transformação.

Tabela 3. *Primers* dos genes alvos de *Tuta absoluta* escolhidos para clonagem em pGEMT Easy

Gene alvo	Sequência (5'- 3')	Tamanho do Amplicon (pb)
<i>farnesoic acid o-methyl transferase (FAMet)</i>	GCCCGCAGGTACATACAGAT CACATGAGGACCAAGCACTC	444
<i>juvenile hormone acid methyltransferase (JHAMT)</i>	AGATTTTGC GGCAGTTCATC GCGAGTCGTGATAGGGAGAG	381
<i>juvenile hormone inducible protein (JHP)</i>	GAAATTCGAGCCCATAGTCG ATCTCTGCGCTGTTCACCTT	168
<i>juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)</i>	GCATCAGGCATTTCCAAGTT GCTGGATCGGAGAATCCATA	433
<i>ecdysteroid 25-hydroxylase (PHM)</i>	GCCCAATGTACGGCATTAGT ACCGAATGAATGGCAAAAAG	489
<i>insect intestinal mucin precursor (MUCIN)</i>	CTGATTGGCACACCCATTG GTTGTCTCCACCGTTGTCAC	206
<i>chitin synthase A(CHI)</i>	CAGAGGGGAAAGCTCTCATGG CGAACGAAGTCCAGTTGTCA	419
<i>glutathione S-transferase epsilon 2 (GST)</i>	AACGCTTTTTCGGAAGTTTCA CAATCCTTCAGCGTTTCCTT	298
<i>carboxylesterase (COE)</i>	ACGGTTTTTGGAAACAGTGC AAACATTTGCCCACTGAACC	451
<i>alkaline phosphatase (AP)</i>	CCACCTCGAAGCAGACTCTC TCTCGTCCTCCAGCAAGATT	470

3.2.4.4. Síntese de dsRNA *in vitro*

A partir dos clones com os fragmentos de regiões dos genes alvos de *T. absoluta* inseridos no vetor pGEM-T Easy, foi realizada a síntese do dsRNA por transcrição *in vitro* com a enzima T7 RNA polimerase (MegaScript T7, Ambion, Thermo Fischer), segundo as recomendações do fabricante. O vetor pGEM-T Easy contém a região de inserção do gene flanqueado pelos sítios T7 e SP6, e as sequências alvo foram amplificadas utilizando-se *primer* T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG), juntamente com um *primer* em que a sequência SP6 é seguida pela sequência do *primer* T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGGATTAGGTGACACTATAG). Desta forma, por amplificação, foram obtidas sequências dos genes de interesse flanqueadas por dois sítios de anelamento da polimerase T7. Esta reação de amplificação para adição dos sítios T7 às

sequências alvo molde foi realizada contendo 25 ng de DNA plasmidial, 2,5 mM de $MgCl_2$, 100 μM de dNTP, 0,1 μM de cada *primer* e 2 U de *Taq* polimerase em tampão de $(NH_4)_2SO_4$ e volume final de 25 μL . As condições do termociclador foram 95°C por 2 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 1 min, com 72°C por 2 min de extensão final. As reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) e os fragmentos de interesse foram extraídos do gel e purificados com o *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) de acordo com as orientações do fabricante. A sequência molde foi quantificada em fluorômetro DyNA Quant 200 e utilizada em reação de transcrição *in vitro* contendo cerca de 500 ng de DNA molde, tampão da enzima, 7,5 mM de cada ribonucleotídeo, 200 U de RNA polimerase MegaScript T7 em volume de 20 μL . A reação foi incubada a 37°C por cerca de 8 h. Em seguida, foi realizada a purificação do dsRNA por precipitação com $LiCl_2$ de acordo com as orientações do fabricante. A quantificação do dsRNA foi realizada no (QUBIT 3.0 Fluorometer -Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA), no modo ssRNA *High Sensitivity*, seguindo as orientações do fabricante.

Para o tratamento de controle negativo nos ensaios de alimentação de lagartas de *T. absoluta* com fita dupla de dsRNA, foi confeccionado um dsRNA do gene *GFP* (*Green Fluorescent Protein*). Para isso, a sequência do gene *GFP* foi obtida a partir do vetor pCAMBIA 1303 com sequência amplificada utilizando-se os *primers* GFP-F (5'TAATACGACTCACTATAGGGCAGTGGAGAGGGTGAA) e GFP-R (5'TAATACGACTCACTATAGGGTTGACGAGGGTGTCTC) contendo segmentos gene-específicos seguidos pela sequência do *primer* T7 *forward* e *reverse* (nucleotídeos sublinhados), amplificando 316 pb. Dessa maneira, o produto de amplificação foi flanqueado pela sequência do promotor T7, que foi empregado para realizar a transcrição *in vitro*. As reações de amplificação do molde e transcrição *in vitro* foram realizadas nas mesmas condições descritas para os genes alvos, obtendo o fragmento de dsRNA.

3.2.4.5. Fornecimento de dsRNA transcrito *in vitro* à *T. absoluta* para análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

O fornecimento de dsRNA transcrito *in vitro* à *T. absoluta* foi realizado segundo a metodologia descrita por Camargo et al. (2016). Para isto, folíolos de tomateiro 'Santa Clara' foram destacados de plantas cultivadas em casa-de-vegetação e imersos em 200 μL de solução aquosa contendo cerca de 5 μg dos respectivos dsRNAs dos genes alvos,

isoladamente em microtubos. Após absorção da solução, os folíolos foram mantidos em água e cerca de 60 lagartas de *T. absoluta* recém-eclodidas, provenientes da criação, foram colocadas para se alimentarem. Os folíolos com as lagartas foram acondicionadas em gaiolas de plástico (Figura 5) e mantidas em sala climatizada a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa 70% e fotofase de 14 h. Após os períodos de alimentação de 72 h e 96 h, 30 lagartas foram coletadas para análise de expressão gênica. O experimento contou com dois controles negativos que foram: 1) folíolos que absorveram solução de 200 μL contendo 5 μg dsRNA do gene *GFP* e 2) folíolos que absorveram somente água deionizada autoclavada. Nos folíolos dos controles negativos também foram colocadas 60 lagartas recém-eclodidas e acondicionados da mesma maneira que os tratados com dsRNA gene *T. absoluta*. Para cada tratamento, foram realizadas 4 repetições. Os efeitos do silenciamento gênico nas lagartas foram analisados por meio da análise da amplificação quantitativa de transcritos reversos por meio de RT-qPCR. Dos genes clonados em pGEM-T *Easy* foram testados somente 3 deles (Tabela 4), devido a alteração de metodologia, utilizando dieta artificial e bactérias expressando dsRNA, conforme descrito no item 3.2.5.

Figura 5. Gaiola com folíolo de tomate que absorveu dsRNA sintetizado *in vitro*, com lagartas de *Tuta absoluta*.

3.2.4.6. Análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

Para as análises de amplificação quantitativa de transcritos reversos, o RNA total de 30 lagartas de cada repetição de cada tratamento foi extraído separadamente utilizando

TRIzol, seguidos de tratamento de DNase I e síntese de cDNA conforme descrito nos itens 3.2.4.1 e 3.2.4.2. As reações de RT-qPCR foram realizadas com 5 ng de cDNA (quantificado em NanoDrop 2000 - Thermo Scientific), 5 µL de *SYBR Green Platinum* (Invitrogen), 0,2 µM de cada *primer* (Tabela 2) num volume final de 10 µL de reação. Todos os *primers* foram testados para eficiência de reação (E) por meio de curva padrão obtida com os valores de expressão de quatro diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) de um *mix* de cDNA proveniente dos 4 ínstares larvais. O perfil de reação foi estabelecido com duas temperaturas iniciais: 50°C por 10 min e 95°C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de três passos: 95°C por 15 s, 60°C por 25 s e 72°C por 30 s realizadas no termociclador RotorGene-6000 (Qiagen; Hilden, Alemanha). Após a amplificação, determinou-se a curva de dissociação (*melting curve*) entre 72°C e 95°C.

As análises de RT-qPCR dos genes alvo de silenciamento nos experimentos foram realizadas em triplicata técnica e triplicata biológica, com controle negativo sem cDNA. Em todos os experimentos, os valores de C_Q foram utilizados para determinar a diferença de expressão gênica de acordo com o método “Delta Delta” (Livak e Schmittgen, 2001): razão = $2^{-\Delta(\Delta C_Q)}$, sendo $\Delta C_Q = C_Q(\text{gene alvo}) - C_Q(\text{gene referência})$ e o $\Delta = \Delta C_Q(\text{tratamento}) - \Delta C_Q(\text{controle})$. Após a determinação dos valores de expressão gênica, estes foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e os valores médios dos tratamentos foram comparados pelo teste Tukey, com 5% de significância, utilizando o software estatístico R (R Core Team, 2017). Foram utilizadas como controles negativos lagartas que receberam o dsRNA referente ao gene *GFP* e lagartas que receberam a solução de água sem dsRNA. Como gene de referência foi utilizado o gene que apresentou melhor estabilidade no teste descrito no item 3.2.4.7.

Tabela 4. *Primers* RT-qPCR dos genes alvos utilizados em reações de análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR).

Gene alvo	<i>Primers</i> RT-qPCR (5'- 3')	Amplicon (pb)
<i>juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)</i>	CAAGAAGTTCTACGTCCAAG CAGGGGGACAGGCTGGTAAG	118
<i>ecdysteroid 25-hydroxylase (PHM)</i>	AAAATGCTGGGTTTGGAGAC ATGTTCCCTCCGTGTCTAATG	129
<i>insect intestinal mucin precursor (MUCIN)</i>	ACTTCAGGTCTGTGACTGGC TCACCTCCGTTATCACCTCC	107

3.2.4.7. Genes de referência para análise de expressão gênica de *Tuta absoluta*

Primeiramente, foram selecionados genes de referência usualmente empregados em experimentos de RNAi e como referência em análises de RT-qPCR em lepidópteros (Camargo, 2014; Chandra et al., 2014; Camargo et al., 2015; Ridgeway e Timm, 2015) (Tabela 5). Foram escolhidos cinco genes a serem empregados como referência, sendo que três deles (*proteína ribossomal RpL5*, *proteína ribossomal RpL23A* e *RNA ribossomal 18S*) foram os mesmos utilizados como genes de referência em trabalhos realizados com *T. absoluta* (Camargo, 2014; Camargo et al., 2015; Camargo et al., 2016). Após a seleção, os *primers* para RT-qPCR foram desenhados, utilizando o *software* Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000) (Tabela 5). Em seguida, foi realizada a avaliação da eficiência dos *primers* por meio de reação RT-qPCR, utilizando como cDNA molde um *mix* de cDNAs de lagartas de cada um dos quatro ínstares larvais (descrito no item 3.2.4.2). Para a reação de eficiência, este *mix* de cDNA foi diluído nas concentrações de trabalho de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , utilizando triplicatas técnicas.

Após a avaliação da eficiência dos *primers*, foram realizadas reações de RT-qPCR para a avaliação da estabilidade ao longo dos quatro ínstares larvais e durante o período do experimento de fornecimento de dsRNA sintetizado *in vitro* (item 3.2.4.5). Na avaliação da estabilidade dos genes de referência durante o experimento de fornecimento de dsRNA *in vitro*, foram utilizados os cDNAs de todos os tratamentos: lagartas sob tratamento com água; dsRNA *GFP* e dsRNA de um gene alvo. O gene que apresentou maior estabilidade na análise dos transcritos reversos em lagartas com 72 h e 96 h após inoculação em folíolo foi utilizado como gene de referência na análise de silenciamento do experimento de fornecimento de dsRNA sintetizado *in vitro* (item 3.2.4.6).

Já na avaliação da estabilidade dos genes de referência durante os ínstares larvais, cada um dos quatro ínstares foi utilizado nas reações com cada um dos genes de referência testados. O gene que apresentou maior estabilidade, ao longo dos quatro ínstares larvais foi utilizado como gene de referência para análise de transcritos reversos RT-qPCR dos experimentos com bactérias expressando dsRNA de *T. absoluta* (item 3.2.5.6). Isto porque, nesse experimento, foram coletadas lagartas em cinco períodos (3, 6, 9, 12 e 15 dias) para as análises de transcritos reversos e, portanto, o gene de referência deveria ser representado por um gene isento de variação em sua expressão durante o período larval.

As análises de estabilidade foram realizadas por meio do *software* NormFinder (versão 0.953) (Andersen et al., 2004), que calcula o valor de estabilidade entre os genes testados, utilizando os valores de *Cycle quantification* (C_Q) das reações de RT-qPCR.

Tabela 5. Genes de referência escolhidos para teste de estabilidade com seus respectivos *primers* de RT-qPCR e tamanho de amplicon esperado.

Gene	Sigla	Sequência do <i>primer</i> 5' - 3'	Amplicon (pb)
<i>elongation factor 1-alpha</i>	<i>EF1 alpha</i>	CCTGGGCACAGAGATTTCAT GTCCGTTCTTGGAGATACCG	118
<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>GAPDH</i>	GACACGCACTCTTCCATCTT ATGACACGGCTGGAGTAACC	110
<i>Rpl 23A - proteína ribossomal</i>	<i>Rpl 23A</i>	TTGACGCCATAACGTGGCAGT CGCAAACGCCTGACTGTTCA	170
<i>Rpl 5 - proteína ribossomal</i>	<i>Rpl 5</i>	CAGTCGTCGAGCCAGCAACA TCCCGCATTGAAGGAGACCA	129
<i>RNA 18 S ribossomal</i>	<i>HK1</i>	CGCCGTTGTTGTTTGTGTTGT GCGGATTCTACCCGTCTG	155

3.2.5. Silenciamento gênico utilizando dsRNA produzido por *Escherichia coli* HT115 (DE3)

3.2.5.1. Clonagem de genes em vetor de silenciamento em plasmídeo L4440

Com o objetivo de expressar fita dupla de RNA (dsRNA) dos genes de interesse em *E. coli* cepa HT115 (DE3), os fragmentos gênicos de *T. absoluta* já clonados no plasmídeo pGEMT-*Easy* (item 3.2.4.3.), conservados a -80°C, foram subclonados no plasmídeo de silenciamento L4440 (Addgene, Cambridge, MA, EUA; plasmid # 1654), o qual permite que o fragmento se localize entre duas regiões promotoras T7 (antes e depois do fragmento clonado). Assim, o vetor pGEMT-*Easy* contendo os fragmentos gênicos de interesse e o plasmídeo L4440 foram digeridos com enzima de restrição *EcoRI* por 16 h a 37°C. Após este período, o produto da digestão foi verificado em gel de agarose 1% em tampão TAE, na presença de marcador de peso molecular (100 pb). Os fragmentos gênicos de interesse

apresentam tamanho variado (Tabela 6) e o plasmídeo L4440 possui 2790 pb. Após a observação, as bandas de peso molecular esperadas foram recortadas do gel de agarose e purificadas com *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), segundo recomendações do fabricante. Em seguida, os fragmentos foram quantificados em fluorímetro *DyNA Quant 200 fluorometer*. Após a quantificação, os fragmentos foram submetidos à reação de ligação utilizando enzima de ligação T4 DNA ligase (Invitrogen). Em seguida, foi realizada a transformação por eletroporação em células competentes de *E. coli* (DH5 α), seguida de plaqueamento em meio LB com antibiótico ampicilina (100 mg/mL) e mantidas a 37°C durante 16 h. Após este período, cada uma das colônias positivas foram repicadas em meio LB líquido com antibiótico ampicilina (100 mg mL⁻¹) e mantidas a 37°C durante 16 h sob agitação de 120 rpm. Em seguida, foram realizadas reações de PCR de cada colônia com *primers* específicos de cada gene para confirmação da clonagem (Tabela 4). Para isto, 1 μ L de cultura bacteriana foi coletado e transferido para microtubo de 500 μ L, contendo 9 μ L de água deionizada autoclavada. Em seguida, os microtubos foram colocados em termociclador a 95°C por 10 min. Em seguida, foram acrescentados aos microtubos os componentes da reação de PCR para um volume final de 25 μ L de reação contendo 1,5 mM de MgCl₂, 400 μ M de cada dNTP, 0,2 μ M de cada primer, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas) em tampão (NH₄)₂SO₄. Em seguida, as reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE. Com as colônias positivas foram realizadas minipreparação plasmidial e estocadas a -20°C, para confirmação via sequenciamento por sequenciador 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems), antes da transformação em *E. coli* HT115 (DE3). Para ser utilizado como um dos controles negativos do experimento foi realizado a minipreparação plasmidial de célula de *E. coli* (DH5 α) contendo o plasmídeo L4440 com inserto gene *green fluorescence protein* (GFP), GFP:L4440 (Addgene plasmid # 11335), sendo o fragmento de GFP de 869 pb. Em seguida, o DNA plasmidial GFP:L4440 foi quantificado em fluorímetro DyNA Quant 200 fluorometer e utilizado também na transformação em *E. coli* HT115 (DE3).

Tabela 6. Genes de *Tuta absoluta* clonados em pL4440 com seus respectivos *primers* utilizados para confirmação da clonagem e tamanho do fragmento clonado.

Genes clonados em pL4440	<i>Primers</i> utilizados para confirmação da clonagem em pL4440 (5'- 3')	Tamanho do frangmento clonado em pL4440 (pb)
<i>juvenil hormone inducible protein (JHP)</i>	GAAATTCGAGCCCATAGTCG ATCTCTGCGCTGTTACCTT	168
<i>juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)</i>	GCATCAGGCATTTCCAAGTT GCTGGATCGGAGAATCCATA	433
<i>ecdysteroid 25-hydroxylase (PHM)</i>	GCCCAATGTACGGCATTAGT ACCGAATGAATGGCAAAAAG	489
<i>chitin synthase A (CHI)</i>	CAGAGGGAAAGCTCTCATGG CGAACGAAGTCCAGTTGTCA	419
<i>glutathione S-transferase epsilon 2 (GST)</i>	AACGCTTTTCGGAAGTTTCA CAATCCTTCAGCGTTTCCTT	298
<i>carboxylesterase (COE)</i>	ACGGTTTTTGGAAACAGTGC AAACATTTGCCCACTGAACC	451
<i>alkaline phosphatase (AP)</i>	CCACCTCGAAGCAGACTCTC TCTCGTCCTCCAGCAAGATT	470
<i>arginine kinase (AK)</i> (Camargo, 2014)	AGGCAGGGGTTGAAGGGG CGTGTTCGCTGACCTGTTCG	262

3.2.5.2. Culturas eletrocompetentes de *Escherichia coli* HT115 (DE3)

Para o preparo de células competentes de *E. coli* HT115 (DE3) foi realizado o cultivo bacteriano com células estoque armazenadas em solução 50% de glicerol a -80°C, em placa contendo meio LB sólido com antibiótico tetraciclina (12,5 mg mL⁻¹) por 16 h a 37°C. Posteriormente, foi realizado o pré-inóculo transferindo-se uma colônia para 25 mL de meio LB líquido com tetraciclina (12,5 mg mL⁻¹) e incubado durante 16 h a 37°C sob agitação de 100 rpm. Em seguida, o pré-inóculo de bactérias foi inoculado em 500 mL de meio LB líquido com tetraciclina (12,5 mg mL⁻¹) e mantido a 37°C e agitação de 100 rpm até atingir a densidade óptica (O.D.) de 0,5 em espectrofotômetro a 550 nm. Em seguida, transferiu-se a cultura bacteriana para frascos de centrifuga estéreis em volumes iguais e incubou-se por 30 min em gelo. Após o período de incubação, foi realizada centrifugação a 2.000 g em centrífuga Srovall rotor GSA (Sorvall, Newtown, CT, EUA) por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de cada frasco foi ressuspensão delicadamente em

200 mL de água deionizada esterilizada gelada e imediatamente centrifugada a 2.000 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano ressuspenso em 10% glicerol e centrifugado novamente. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de 10% glicerol e distribuído em alíquotas de 100 µL que foram estocadas a -80°C até o momento da transformação.

3.2.5.3. Transformação em bactéria *Escherichia coli* HT115 (DE3)

Os plasmídeos L4440 contendo fragmentos de genes *T. absoluta* confirmados por sequenciamento foram quantificados e então, 100 ng adicionados a 100 µL da cultura eletrocompetente HT115 (DE3) e submetidos à eletroporação (Gene Pulser, BioRad, -2,5kV, 25 µF, 200 Ω, cubetas de 0,2 cm) para transformação. As células eletroporadas foram plaqueadas e incubadas por 18 h a 37°C em meio sólido LB contendo ampicilina (100 mg mL⁻¹) e tetraciclina (12,5 mg mL⁻¹). Os clones foram repicados em meio LB líquido com os mesmos antibióticos a 37°C e mantidos por 16 h sob agitação de 120 rpm. Em seguida, foram realizadas reações de PCR de colônia com *primers* específicos de cada gene para confirmação da transformação (Tabela 4). Para isto, 1 µL de cultura bacteriana foi coletado e transferido para microtubo de 500 µL, contendo 9 µL de água deionizada autoclavada. Em seguida, os microtubos foram colocados em termociclador a 95°C por 10 min. Em seguida, foram acrescentados aos microtubos os componentes da reação de PCR para um volume final de 25 µL de reação contendo: 1,5 mM MgCl₂, 400 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada primer, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas) em tampão (NH₄)₂SO₄. As transformações foram confirmadas por análise de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE. As bactérias transformadas foram estocadas a -80°C para serem utilizadas em experimentos. O plasmídeo GFP:L4440 e todos os fragmentos gênicos clonados em L4440 (Tabela 6) foram transformados em *E. coli* HT115 (DE3).

3.2.5.4. Dieta artificial de *Tuta absoluta*

Nos experimentos de fornecimento bactérias *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA de genes alvo específicos foi utilizada a dieta artificial de *T. absoluta* desenvolvida por Bajonero e Parra (2017) (Tabela 7). Para avaliar determinados genes relacionados com detoxificação de compostos secundários, foi utilizada a dieta de Bajonero e Parra (2017) adicionada de folhas de tomateiro liofilizadas. Cerca de 4 mL de dieta foram dispostos em

tubo de vidro (1 cm de diâmetro $\times$ 6 cm de altura) tampados com algodão hidrófobo. Estes tubos foram previamente autoclavados para evitar a contaminação por microorganismos e todo o processo foi realizado dentro de capela de fluxo laminar.

Tabela 7. Composição da dieta artificial de *Tuta absoluta* utilizada nos experimentos de alimentação de lagartas com bactéria *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene alvo (Bajonero e Parra, 2017).

Componentes	dieta	dieta + folhas de tomateiro liofilizadas
Germe de trigo	22,5 g	22,5 g
Celulose	3,7 g	3,7 g
Sacarose	26,2 g	26,2 g
Cloreto de colina	0,7 g	0,7 g
Sais de Wesson *	7,5 g	7,5 g
Caseína	26,2 g	26,2 g
Ácido áscórbico	3,0 g	3,0 g
Metilparahidroxibenzoato (nipagin)	1,5 g	1,5 g
Tetraciclina	0,5 mg	0,5 mg
Formaldeído 37%	1,0 mL	1,0 mL
Solução vitamínica **	7,5 mL	7,5 mL
Ágar	9,0 g	9,0 g
Água	630 mL	630 mL
Pó de folhas de tomateiro “Santa Clara” (liofilizado)	-	4 g

* niacinamida: 1,0 g; pantotenato de cálcio: 1,0 g; riboflavina: 0,50 g; tiamina: 0,5 g; piridoxina: 0,25 g; ácido fólico: 0,10 g; biotina: 0,02 mg; vitamina B12 (1000 mg/mL): 2,00 mL

**carbonato de cálcio: 10,5g; sulfato de cobre (5H₂O): 0,019 g; sulfato de magnésio: 4,5 g; sulfato de potássio e alumínio: 0,005 g; iodeto de potássio: 0,003 g; cloreto de sódio: 5,25 g; fosfato tricálcico: 7,45 g; fosfato férrico: 0,725 g; sulfato de manganês: 0,01 g; cloreto de potássio: 6 g; monofosfato de potássio: 15,5 g; fluoreto de sódio: 0,028 g e água destilada para 100 mL.

3.2.5.5. Alimentação de lagartas de *Tuta absoluta* com dieta artificial contendo dsRNA expresso por *Escherichia coli* HT115 (DE3)

Com o objetivo de avaliar o efeito da presença de *E. coli* expressando dsRNA sobre o desenvolvimento e a expressão gênica em *T. absoluta*, lagartas neonatas foram expostas a alimentação em dieta artificial (item 3.2.5.4) contendo solução bacteriana de *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA dos genes listados na Tabela 6 e também com gene *GFP* (*green fluorescence protein*, 869 pb – Addgene plasmid # 11335). Para isto, uma única colônia de HT115(DE3) transformada com vetor de expressão de dsRNA (pL4440) foi cultivada em meio LB com 100 mg mL⁻¹ de ampicilina e 12,5 mg mL⁻¹ de tetraciclina por 14 h a 37°C sob agitação (120 rpm). Após este período, o meio de cultura foi diluído 100 vezes em 400 mL de meio 2YT (composto de 16 g de triptona, 10 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl por litro, pH 7,0) e mantido em condições ótimas de crescimento (agitação de 120 rpm a 37°C) até atingir OD_{600nm} = 0,4 (Timmons et al., 2001; Li et al., 2011; Zhang et al., 2013). Em seguida foram acrescentados 0,4 mM de IPTG (isopropil β-D-1-thiogalactopiranosídeo) na solução bacteriana e mantidas por 4 h a 37°C sob agitação a 120 rpm. Após este período, foram realizadas leituras de OD_{600nm} e em seguida a solução bacteriana foi centrifugada a 10.000 g por 2 min em centrífuga (Sorvall) e o pellet de bactérias ressuspendido em 4 mL de água milliQ autoclavada. O volume ressuspendido foi corado com 1% de corante artificial alimentício de cor rosa (Coralim, Mix, São Bernado do Campo, Brasil) para melhor visualização do espalhamento da solução bacteriana sobre a dieta artificial. Testes prévios indicaram que o corante não afetou o desenvolvimento bacteriano. Em seguida, foram aplicados 65 µL das suspensões bacterianas sobre a dieta artificial de *T. absoluta* solidificada. Os tubos foram tampados e mantidos por 24 h em temperatura de 25°C para que os 65 µL de solução bacteriana fossem absorvidos pela dieta (Figura 6A). Após esse período, foram inoculadas 3 lagartas neonatas de *T. absoluta* por tubo (Figura 6B). Os experimentos contaram com 60 tubos de dieta por tratamento. Cada experimento contou com três controles negativos: 1) sem nenhuma suspensão bacteriana adicionada; 2) suspensão bacteriana expressando o gene *GFP* e 3) suspensão bacteriana de HT115 (DE3) não transformada com plasmídeo pL4440. Para cada gene testado, o ensaio foi repetido três vezes. Alíquotas de 1,5 mL de solução bacteriana de cada tratamento e controles foram coletadas antes e depois da indução por IPTG e armazenadas (-20°C) para posterior extração e confirmação da produção de dsRNA pelas bactérias (Timmons et al., 2001) por meio de eletroforese de gel de agarose 2% em tampão TAE corado com brometo de etídio (1 mg mL⁻¹) e fotodocumentado. Os

experimentos foram mantidos em câmara climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotofase de 14 h e UR 70%. Os parâmetros biológicos avaliados foram: mortalidade das larvas, peso de pupas (machos e fêmeas) e duração do período larval. Os dados de mortalidade foram analisados por modelo linear generalizado (GLM) do tipo binomial com $p < 0,05$, enquanto que os dados de duração da fase larval foram analisados por GLM do tipo gama com $p < 0,05$ (Demétrio et al., 2014). O parâmetro de peso de pupas foi analisado por meio de análise da variância (ANOVA) com 5% de significância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o uso do *software* estatístico R (R Core Team, 2017).

Figura 6. A - Dieta artificial de *Tuta absoluta* com 65 μL das suspensões bacterianas coradas com corante rosa sobre a dieta artificial; B – Detalhe da inoculação de lagartas nos tubos de dieta.

3.2.5.6. Análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

O efeito do silenciamento gênico nas lagartas provenientes do experimento do item 3.2.5.5 foi analisado pela quantificação da expressão dos genes alvos por meio de RT-qPCR. Após os períodos de alimentação de 3, 6, 9, 12 e 15 dias, 10 lagartas foram coletadas para análise de expressão gênica. Cada um dos tratamentos contou com 3 replicatas biológicas. Para isso, foi extraído o RNA total de 10 lagartas de cada repetição e tratamento separadamente utilizando TRIzol, quantificados em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), seguidos de tratamento de DNase I e síntese de cDNA conforme descrito nos itens 3.2.4.1 e 3.2.4.2. Todos os *primers* foram testados para eficiência de reação (E) por meio de curva padrão obtida com os valores de expressão de quatro diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) de um *mix* de cDNA proveniente dos 4 instares larvais. As reações de amplificação e o perfil de reação foram realizados conforme descrito no item 3.2.4.6, sendo que os *primers* utilizados são descritos na Tabela 8. Após a determinação dos valores de expressão gênica, conforme descrito no item 3.2.4.6, estes foram

submetidos à análise da variância e os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey, com 5% de significância.

Tabela 8. *Primers* utilizados em reações de análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) dos experimentos de alimentação de lagartas de *Tuta absoluta* com dieta artificial contendo dsRNA expresso por *E. coli* HT115 (DE3).

Gene alvo	<i>primers</i> qPCR (5'- 3')	Amplicon (pb)
<i>juvenile hormone inducible protein (JHP)</i>	TGTACTGGAGGAAGAATGCG TCTTTCCCGGACCTTTGAGA	125
<i>juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)</i>	CAAGAAGTTCTACGTCCAAG CAGGGGGACAGGCTGGTAAG	118
<i>ecdysteroid 25-hydroxylase (PHM)</i>	AAAATGCTGGGTTTGGAGAC ATGTTTCCTCCGTGTCTAATG	129
<i>chitin synthase A (CHI)</i>	AGACCACCGAAGAGATACCC CTGAGACCATCGCTTTCTGT	126
<i>glutathione S-transferase epsilon 2 (GST)</i>	GAGCGACAGTAGATCAAAGA TGGTGCTTTCAAATCGCCTG	122
<i>carboxylesterase (COE)</i>	ACTATCGTACCGGCGTCTAC ATGATTTTGCACCCACCTTA	107
<i>alkaline phosphatase (AP)</i>	GTTATTCTTGGCGGTGGAC GCAATTCTAGCCACTCCTCA	115
<i>arginine kinase (AK)</i> (Camargo, 2014)	AGGCAGGGGTTGAAGGGG CGTGTTCGCTGACCTGTTCG	192

3.3. Resultados

3.3.1. Análise de especificidade e clonagem de genes de *Tuta absoluta* em vetor pGEM-T Easy

Foram selecionados dez genes de *T. absoluta* como alvos de silenciamento por RNAi, sendo: quatro envolvidos em síntese e degradação do Hormônio Juvenil (*farnesoic acid o-methyl transferase* - *FAMet*; *juvenile hormone inducible protein* - *JHP*; *juvenile hormone epoxide hydrolase protein* - *JHEH* e *juvenile hormone acid methyltransferase* - *JHAMT*), um envolvido na síntese do ecdisônio (*ecdysteroid 25-hydroxylase* – *PHM*), dois envolvidos em síntese de componentes estruturas de tecido de revestimento do inseto (*chitin*

synthase A – CHI e *insect intestinal mucin precursor – MUCIN*), dois envolvidos em detoxificação ou desintoxicação de compostos tóxicos (*glutathione S-transferase epsilon 2 – GST* e *carboxylesterase – COE*) e um envolvido na síntese de proteínas de transporte presentes nas células do mesêntero dos insetos (*alkaline phosphatase – AP*). Os genes *JHP*, *MUCIN*, *GST*, *COE* e *AP*, além de estarem ligados a processos metabólicos essenciais a fisiologia e desenvolvimento de insetos citados acima, foram diferencialmente expressos na fase larval em relação à fase de ovo e adulto, na análise de RNA_seq do transcriptoma de *T. absoluta* (Camargo et al., 2015).

Por meio da amplificação de cDNA proveniente dos quatro ínstares de lagartas de *T. absoluta*, foram clonados com sucesso somente oito genes no vetor pGEM-T *Easy* (Tabela 9).

O gene *arginine kinase (AK)* clonado em pGEM-T *Easy* e utilizado por Camargo (2014) foi realizado análise de especificidade.

A sequência destes genes foram avaliados quanto à especificidade em organismos não alvos (Tabela 10). Conforme se pode observar na análise de especificidade nenhum dos genes alvos apresenta 100% de identidade com sequências de tamanho maior ou igual a 21 nucleotídeos (nt) de *Homo sapiens* e *Solanum lycopersicum*. Na análise do gene *JHP* foi encontrada uma sequência com 100% de identidade (21/21 nt) da Ordem Insecta da espécie *Drosophila ananassae*. Para o gene *JHEH* não foi encontrada nenhuma sequência com 100% de identidade para Ordem Insecta, porém foi encontrada com 22/22 nt para a espécie *Theobroma cacao*. Na análise do gene *PHM* foram encontradas três sequências com 100% de identidade (21/21 nt) da Ordem Insecta, das espécies *Drosophila miranda*, *Drosophila pseudoobscura* e *Drosophila persimilis*. Para os genes *MUCIN* e *CHI* não foi encontrada nenhuma sequência com 100% de identidade para nenhum organismo. Na análise do gene *GST* foi encontrada uma sequência com 100% de identidade (22/22 nt) para Ordem Insecta, *Bactrocera oleae* e quatro sequências com 100% de identidade (22/22 nt) para três espécies: *Ricinus communis* (mamona), *Haplochromis nyererei* (peixe endêmico da África), *Haplochromis burtoni* (peixe endêmico da África). Para o gene *COE* foi encontrada duas sequências com 100% de identidade (21/21 nt) para Ordem Insecta, *Stomoxys calcitrans* (mosca do estábulo) e duas sequências (22/22 nt) para duas espécies de animais *Dasypus novemcinctus* (tatu galinha), *Carlito syrichta* (uma espécie de tásio endêmico das Filipinas). Para o gene *AP* foi encontrada duas sequências com 100% de identidade (21/21 nt e 22/22 nt) para as espécies de inseto *Amyelois transitella* e *Drosophila obscura* e uma sequência com 100% de identidade (22/22 nt) para espécie de alga *Chlorella variabilis*. Por fim para o gene *AK* não foi encontrada nenhuma sequência com 100% de identidade para nenhum organismo

(Tabela 10). O alinhamento resultante das análises de especificidade das espécies em que as sequências apresentam 100% de identidade com as sequências gênicas de *T. absoluta* se encontram no Anexo.

A clonagem dos genes foi confirmada por sequenciamento e a identidade das sequências foi comparada com sequências depositadas no banco de dados do NCBI. As sequências, mais idênticas, encontradas pelo Blastx foram alinhadas com as sequências dos genes alvos de *T. absoluta* provenientes do sequenciamento, utilizando o programa MultiAlign (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14).

Tabela 9. Fragmentos de genes de *Tuta absoluta* clonados em pGEM-T Easy.

Gene clonados em pGEM-T Easy	Tamanho do fragmento clonado (pb)
<i>juvenile hormone inducible protein (JHP)</i>	168
<i>juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)</i>	433
<i>ecdysteroid 25-hydroxylase (PHM)</i>	489
<i>insect intestinal mucin precursor (MUCIN)</i>	206
<i>chitin synthase A (CHI)</i>	419
<i>glutathione S-transferase epsilon 2 (GST)</i>	298
<i>carboxylesterase (COE)</i>	451
<i>alkaline phosphatase (AP)</i>	470

Tabela 10. Análise de especificidade de genes de *Tuta absoluta* clonados em pGEM-T Easy.

Genes	Número de sequências com identidade 100% (≥ 21 nucleotídeos) - data base: Refseq RNA			
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Ordem Insecta</i>	Qualquer espécie
<i>juvenil hormone inducible protein (JHP)</i>	0	0	1 (1-21/21)	0
<i>juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)</i>	0	0	0	1 (22/22)
<i>ecdysteroid 25-hydroxylase (PHM)</i>	0	0	3 (21/21)	0
<i>insect intestinal mucin precursor (MUCIN)</i>	0	0	0	0
<i>chitin synthase A (CHI)</i>	0	0	0	0
<i>glutathione s-transferase epsilon 2 (GST)</i>	0	0	1 (22/22)	4 (22/22)
<i>carboxylesterase (COE)</i>	0	0	2 (21/21)	2 (22/22)
<i>alkaline phosphatase (AP)</i>	0	0	2 (21/21 e 22/22)	1 (22/22)
<i>Arginine kinase (AK)</i>	0	0	0	0

juvenil hormone inducible protein (JHP)

Figura 7. Alinhamento das sequências de aminoácidos conceitualmente traduzidos a partir do fragmento gênico clonado em pGEMT-Easy do gene *juvenile hormone inducible protein (JHP)* de *Tuta absoluta* com sequências protéicas de outras espécies de insetos (*Danaus plexippus plexippus*; *Bombyx mori* e; *Operophtera brumata*) para confirmação de identidade.

juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)

Figura 8. Alinhamento das sequências de aminoácidos conceitualmente traduzido a partir do fragmento gênico clonado em pGEMT-Easy do gene *juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)* de *Tuta absoluta* com sequências protéicas de outras espécies de insetos (*Danaus plexippus plexippus*, *Bombyx mori*, *Amyelois transitella* e *Spodoptera exigua*) para confirmação de identidade.

ecdysteroid 25-hydroxylase (PHM)

Figura 9. Alinhamento das sequências de aminoácidos conceitualmente traduzido a partir do fragmento gênico clonado em pGEMT-Easy do gene *ecdysteroid 25-hydroxylase (PHM)* de *Tuta absoluta* com sequências protéicas de outras espécies de insetos (*Spodoptera littoralis*, *Mamestra brassicae* e *Bombyx mori*) para confirmação de identidade.

insect intestinal mucin precursor (MUCIN)

Figura 10. Alinhamento das sequências de aminoácidos conceitualmente traduzidos a partir do fragmento gênico clonado em pGEMT-Easy do gene *insect intestinal mucin precursor (MUCIN)* de *Tuta absoluta* com sequências protéicas de outras espécies de insetos (*Operophtera brumat* e *Plutella xylostella*) para confirmação de identidade.

Figura 11. Alinhamento das sequências de aminoácidos conceitualmente traduzidos a partir do fragmento gênico clonado em pGEMT-Easy do gene *chitin synthase A (CHI)* de *Tuta absoluta* com sequências protéicas de outras espécies de insetos (*Choristoneura fumiferana*, *Ostrinia furnacalis* e *Bombyx mori*) para confirmação de identidade.

Figura 12. Alinhamento das sequências de aminoácidos conceitualmente traduzidos a partir do fragmento gênico clonado em pGEMT-Easy do gene *glutathione S-transferase epsilon 2 (GST)* de *Tuta absoluta* com sequências protéicas de outras espécies de insetos (*Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* e *Amyelois transitella*) para confirmação de identidade.

Figura 13. Alinhamento das sequências de aminoácidos conceitualmente traduzidos a partir do fragmento gênico clonado em pGEMT-Easy do gene *alkaline phosphatase (AP)* de *Tuta absoluta* com sequências protéicas de outras espécies de insetos (*Pieris rapae*, *Bombyx mori* e *Cnaphalocrocis medinalis*) para confirmação de identidade.

Figura 14. Alinhamento das sequências de aminoácidos conceitualmente traduzidos a partir do fragmento gênico clonado em pGEMT-Easy do gene *alkaline phosphatase (AP)* de *Tuta absoluta* com sequências protéicas de outras espécies de insetos (*Operophtera brumata*, *Danaus plexippus plexippus* e *Bombyx mori*) para confirmação de identidade.

3.3.2. Análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) de lagartas de *Tuta absoluta* alimentadas com folha de tomateiro contendo dsRNA transcrito *in vitro*

O objetivo desse experimento foi avaliar o silenciamento gênico dos genes de *T. absoluta* escolhidos e clonados em pGEM-T *Easy*, por meio da expressão em lagartas ($n=30$) após os períodos de alimentação de 72 h e 96 h, em folíolos de tomateiro ‘Santa Clara’ previamente imersos em solução aquosa com dsRNA dos genes alvos (metodologia desenvolvida por Camargo et al., 2016). Dos oito genes clonados em pGEM-T *Easy*, somente três foram testados com essa metodologia: *juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)*, *ecdysteroid 25-hydroxylase (PHM)* e *insect intestinal mucin (MUCIN)*.

Para a análise de expressão gênica foi realizado o teste de estabilidade dos genes de referências por meio do *software NormFinder* (item 3.2.4.7.) O gene que apresentou maior estabilidade na análise dos transcritos reversos em lagartas com 72 h e 96 h após inoculação em folíolo foi o *RpL23A - proteína ribossomal* (Camargo, 2014; Camargo et al., 2015; Camargo et al., 2016), seguido do *elongation factor 1-alpha* e do *18S ribossomal RNA* (Tabela 11). Assim sendo, o gene *RpL23A - proteína ribossomal*, que apresentou maior estabilidade (valor mais próximo de zero) foi utilizado como gene de referência na análise de RT-qPCR do experimento de fornecimento de dsRNA sintetizado *in vitro*, utilizando folhas de tomateiro.

Tabela 11. Valores de estabilidade para genes de referência durante o período dos experimentos de fornecimento de dsRNA produzido *in vitro* (72 e 96 h).

Gene de Referência	Valor de estabilidade
<i>proteína ribossomal RpL23A</i>	0,10
<i>Elongation factor 1-alpha</i>	0,14
<i>RNA ribossomal 18 S</i>	0,18
<i>proteína ribossomal RpL5</i>	0,18
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	0,21

A expressão relativa do *JHEH* foi analisada e nos períodos de 72 e 96 h, e não se observou uma redução no acúmulo de transcritos em relação ao tratamento sem dsRNA (controle negativo, contendo somente água) e ao tratamento dsRNA *GFP* (Figura 15). Porém, diferentemente do esperado, no controle negativo onde foi fornecido dsRNA *GFP*, as lagartas apresentaram redução na expressão relativa do gene *JHEH* (Figura 15).

Já nas análises de expressão do gene *PHM*, observou-se que não há diferença na expressão em relação aos controles no período de 72 h; porém, verifica-se um maior acúmulo de transcritos a 96 h em relação aos controles água e dsRNA *GFP* (Figura 16). Na avaliação da expressão relativa do gene *MUCIN* em lagartas de *T. absoluta*, nos períodos de 72 e 96 h, não foi observado alteração na expressão (Figura 11).

Figura 15. Expressão gênica relativa de lagartas ($n=30$) de *Tuta absoluta* após se alimentarem de folhas de tomateiro contendo dsRNA dos genes *juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)* e *green fluorescence protein (GFP)* nos períodos de 72 e 96 horas. O tratamento água refere-se à expressão gênica relativa das lagartas que se alimentaram de folhas tratadas com solução sem dsRNA (controle negativo).

Figura 16. Expressão gênica relativa de lagartas ($n=30$) de *Tuta absoluta* após se alimentarem de folhas de tomateiro contendo dsRNA dos genes *ecdysteroid 25-hydroxylase* (PHM) e *green fluorescence protein* (GFP) nos períodos de 72 e 96 horas. O tratamento água refere-se à expressão gênica relativa de lagartas que se alimentaram de folhas tratadas com solução sem dsRNA (controle negativo).

Na avaliação da expressão relativa do gene *insect intestinal mucin* (MUCIN) em lagartas de *T. absoluta*, nos períodos de 72 e 96 h, também não foi observado alteração na expressão (Figura 17).

Figura 17. Expressão gênica relativa de lagartas ($n=30$) de *Tuta absoluta* após se alimentarem de folhas de tomateiro contendo dsRNA dos genes *insect intestinal mucin* (MUCIN) e *green fluorescence protein* (GFP) nos períodos de 72 e 96 horas. O tratamento água refere-se à expressão gênica relativa de lagartas que se alimentaram de folhas tratadas com solução sem dsRNA (controle negativo).

Essa metodologia de entrega de dsRNA a *T. absoluta* não demonstrou efeito de silenciamento, além de apresentar problemas tais como: dependência de plantas de tomateiro saudáveis; padronização de folíolos de tomateiro de mesma idade; folíolos de tomateiro após absorção de solução de dsRNA murchavam impedindo a continuação do experimento e necessidade de muitos processos de transcrição *in vitro* para garantir as quantidades de dsRNA necessárias ao experimento. Somado a isto, uma dieta de *T. absoluta* havia sido ajustada como adequada no laboratório de Biologia de Insetos – ESALQ/USP (Bajonero e Parra, 2017), viabilizando a experimentação. Assim, optou-se por adotar uma nova metodologia para *T. absoluta*, utilizando dieta artificial (Bajonero e Parra, 2017) e adicionando bactérias transformadas de *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA.

3.3.3. Confirmação de produção de fita dupla de RNA (dsRNA) por *Escherichia coli* HT115 (DE3)

Para os experimentos de alimentação de lagartas de *T. absoluta* em dieta artificial contendo bactérias *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA, foram clonados em pL4440 e

avaliados os seguintes genes: *green fluorescence protein* (utilizado como controle negativo); *juvenile hormone inducible protein* (*JHP*); *juvenile hormone epoxide hydrolase protein* (*JHEH*); *ecdysteroid 25-hydroxylase* (*PHM*); *chitin synthase A* (*CHI*); *glutathione S-transferase epsilon 2* (*GST*); *carboxylesterase* (*COE*); *alkaline phosphatase* (*AP*) e *arginine kinase* (*AK*). Para o gene *insect intestinal mucin* (*MUCIN*), que estava clonado em pGEM-T Easy, não foi obtido sucesso na clonagem em pL4440, não sendo testado com esta metodologia. Nesses experimentos era necessário a comprovação da indução das bactérias HT115 (DE3) transformadas com os genes de *T. absoluta* e expressão de dsRNA.

Assim, utilizando processo de extração de dsRNA (Timmons et al., 2001) foi possível comprovar que todas as bactérias HT115 (DE3) transformadas com os genes de *T. absoluta*, utilizadas nos experimentos (item 3.3.4), expressaram dsRNA após indução, conforme apresentados nas figuras dos géis de 2% agarose em tampão TAE, corado com brometo de etídio (1 mg mL⁻¹) (Figuras 18 e 19). A bactéria HT115(DE3) não transformada foi utilizada como controle negativo do produto de extração de dsRNA.

Figura 18. Produtos da extração de dsRNA de bactérias HT115(DE3) em gel de agarose. 1 - bactéria HT115 (DE3) não transformada sem indução com IPTG; 2 - bactéria HT115 (DE3) não transformada induzida com IPTG; 3 - HT115 (DE3) transformada pL4440:*GFP* sem indução; 4 - HT115 (DE3) transformada pL4440:*GFP* induzida; 5 - HT115 (DE3) transformada pL4440:*AK* sem indução; 6 - HT115 (DE3) transformada pL4440:*AK* induzida; 7 - HT115 (DE3) transformada pL4440:*GST* sem indução; 8 - HT115 (DE3) transformada pL4440:*GST* induzida; 9 - HT115 (DE3) transformada pL4440:*CHI* sem indução; 10 - HT115 (DE3) transformada pL4440:*CHI* induzida; 11 - HT115 (DE3) transformada pL4440:*JHP* sem da indução; 12 - HT115 (DE3) transformada pL4440:*JHP* induzida IPTG.

Figura 19. Gel de eletroforese com produtos da extração de dsRNA de bactérias HT115(DE3). 1; HT115 (DE3) transformada pL4440:AP sem indução com IPTG; 2 - HT115 (DE3) transformada pL4440:AP induzida com IPTG; 3 - HT115 (DE3) transformada pL4440:PHM sem indução; 4 - HT115 (DE3) transformada pL4440:PHM induzida; 5 - HT115 (DE3) transformada pL4440:COE sem indução; 6 - HT115 (DE3) transformada pL4440:COE induzida; 7 - HT115 (DE3) transformada pL4440:JHEH sem indução; 8 - HT115 (DE3) transformada pL4440:JHEH induzida.

3.3.4. Efeito da alimentação de lagartas com dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* e na amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

A partir da clonagem dos fragmentos dos genes de *T. absoluta* em *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA foram conduzidos ensaios para avaliar o efeito da ingestão dessas bactérias no desenvolvimento dos insetos. Foram avaliados os parâmetros mortalidade da fase larval (%); duração da fase larval (dias) e peso de pupas (mg). As diversas construções dos oito genes foram adicionados à dieta artificial que foi então oferecida as lagartas. Na apresentação dos resultados foram denominados “dieta” como dieta artificial sem adição de *E. coli* HT115 (DE3); “HT115 não transformada” como dieta artificial contendo *E. coli* HT115 (DE3) não transformada com plasmídeo L4440; “dsRNA *GFP*” como dieta artificial contendo HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *GFP* e “dsRNA *GENE ALVO*” como dieta artificial contendo com HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene alvo de silenciamento.

Durante o desenvolvimento larval, os tubos de dieta artificial com os tratamentos foram observados diariamente. Caso as lagartas apresentassem algum fenótipo atípico, esses eram registrados fotograficamente. As análises de expressão por RT-qPCR de todos os genes alvos de silenciamento de *T. absoluta* foram conduzidas relativas à expressão do controle contendo HT115 não transformada”, sendo avaliada a expressão relativa dos genes alvos nas lagartas após 3, 6, 9, 12 e 15 dias de alimentação em dieta artificial com os tratamentos. Para a análise de expressão gênica foi realizado uma avaliação de estabilidade dos genes de referências, por meio do *NormFinder*, pois o gene de referência deveria ser representado por um gene que não sofresse alteração na expressão ao longo do período larval de *T. absoluta*.

Assim, o gene *factor 1-alpha (EF-1)* apresentou a melhor estabilidade (Tabela 12), ou seja, o valor mais próximo de zero (0,06), seguidos pelos genes *RpL23A - proteína ribossomal* (0,22) e *RpL5 - proteína ribossomal* (0,23). Então, o gene *EF-1* foi utilizado como gene de referência na análise de transcritos reversos (RT-qPCR) dos experimentos empregando bactérias expressando dsRNA de *T. absoluta*.

Tabela 12. Valores de estabilidade para genes de referência ao longo dos quatro instares larvais de *Tuta absoluta*.

Gene de referência	Valor de estabilidade
<i>Elongation factor 1-alpha</i>	0,06
<i>proteína ribossomal RpL23A</i>	0,22
<i>proteína ribossomal RpL5</i>	0,23
<i>RNA ribossomal 18 S</i>	0,24
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	0,58

Na avaliação da fase larval de *T. absoluta* no tratamento “dsRNA *juvenile hormone inducible protein*” (dsRNA *JHP*) verificou-se uma mortalidade de 45,6%, diferindo significativamente dos controles: “HT115 não transformada” (21,1%); “dsRNA *GFP*” (28,9%) e “dieta” (21,7%) (Figura 20). Algumas lagartas de *T. absoluta* mortas pela ação do tratamento “dsRNA *JHP*” apresentaram a cápsula cefálica reduzida e exoesqueleto preso a porção final do corpo (Figura 21). Isto pode ser um indicativo de que a lagarta não conseguiu se soltar do tegumento antigo pela ação do dsRNA *JHP*. As lagartas que se transformaram em pupas foram sexadas, sendo avaliado o peso de pupas e a duração da fase larval para machos e fêmeas, separadamente. Quanto ao peso de pupas e duração larval de machos e fêmeas, não foram observadas diferenças significativas entre o tratamento “dsRNA *JHP*” e os controles (Tabela 13).

Figura 20. Mortalidade da fase larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *juvenile hormone inducible protein (JHP)*. *GFP* se refere ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pela análise de desvios (GLM, $p < 0,05$).

Tabela 13. Peso de pupas e duração larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *juvenile hormone inducible protein (JHP)*.

Tratamentos	Peso de Pupas (mg) ¹		Duração (dias) ²	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Dieta	3,28 a	4,33 a	29,98 a	29,08 a
Dieta + HT115 não transformada	3,43 a	4,37 a	29,31 a	28,12 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>GFP</i> ³	3,62 a	4,85 a	29,26 a	29,22 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>JHP</i>	3,47 a	4,52 a	25,39 a	28,29 a

¹ colunas seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Macho: $p = 0,189$; Fêmea: $p = 0,062$;

² colunas seguidas pela mesma letra não diferem pela análise dos desvios (GLM, $p < 0,05$). Macho: $p = 0,076$; Fêmea: $p = 0,576$;

³ *GFP*: *green fluorescence protein*.

Figura 21. Fenótipos apresentados por lagartas de *Tuta absoluta* nos tratamentos: A – dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 não transformada, lagarta viva e sadia; B – dieta artificial contendo *E. coli* HT115 expressando dsRNA do gene *juvenile hormone inducible protein* (*JHP*), lagarta morta, as setas vermelhas mostram o antigo exoesqueleto preso ao corpo da lagarta e a cápsula cefálica antiga presa a lagarta.

Houve redução significativa dos transcritos de *JHP* no tratamento “dsRNA *JHP*” em relação ao controle negativo “HT115 não transformada”, sendo menor 52,5%, 36,2%, 57,2%, 47,8% e 42,4% aos 3, 6, 9, 12 e 15 dias de alimentação, respectivamente (Figura 22). Ao comparar a redução significativa do acúmulo de transcritos *JHP* com o aumento da mortalidade (45,6%), verifica-se que o silenciamento gênico induzido pelo dsRNA *JHP* foi eficaz no controle de *T. absoluta*. Observou-se que para o controle negativo “dieta” a expressão do gene *JHP* não foi alterada. No entanto, verifica-se que aos 9 dias de alimentação a expressão do *JHP* no tratamento “dsRNA *GFP*” foi levemente reduzida em relação a “HT115 não transformada” (11,4%) (Figura 22).

Figura 22. Expressão gênica relativa de lagartas ($n=10$) de *Tuta absoluta* após se alimentarem por 3, 6, 9, 12 e 15 dias em dieta artificial com *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *juvenile hormone inducible protein (JHP)*. Como gene de referência, foi usado o gene *elongation factor 1-alpha*. O tratamento “dieta + HT115 não transformada” foi utilizado como referência para expressão relativa. *GFP* refere-se ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Dando continuidade aos genes da rota hormonal do Hormônio Juvenil (JH), o gene *juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)* foi testado e o tratamento com “dsRNA *JHEH*” apresentou aumento na mortalidade (43,3%), sendo somente diferente estatisticamente ao tratamento controle “dieta” (Figura 23).

Figura 23. Mortalidade da fase larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)*. *GFP* se refere ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pela análise de desvios (GLM, $p < 0,05$).

No parâmetro peso de pupas para o gene *JHEH*, não foram observadas diferenças em fêmeas entre os tratamentos (Tabela 14). Porém, nos machos, houve uma redução do peso das pupas nos tratamentos “HT115 não transformada” e “HT115: dsRNA *GFP*” (Tabela 14). Em relação à duração da fase larval, houve uma redução significativa no tratamento “dsRNA *JHEH*” em torno de 5 dias para machos e fêmeas (Tabela 14).

Tabela 14. Peso de pupas e duração larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)*.

Tratamentos	Peso de Pupas (mg) ¹		Duração (dias) ²	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Dieta	3,28 a	5,23 a	29,98 a	29,90 a
Dieta + HT115 não transformada	3,43 b	4,61 a	29,31 a	29,41 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>GFP</i> ³	3,69 b	4,79 a	29,26 a	30,19 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>JHEH</i>	3,71 ab	5,06 a	25,19 b	24,91 b

¹ colunas seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Macho: $p = 0,069$; Fêmea: $p = 0,05$;

² colunas seguidas pela mesma letra não diferem pela análise dos desvios (GLM, $p < 0,05$). Macho: $p = 5,61 \times 10^{-5}$; Fêmea: $p = 6,96 \times 10^{-6}$;

³ *GFP*: green fluorescence protein.

Em relação à expressão do gene *JHEH*, verificou-se redução significativa do acúmulo dos transcritos de *JHEH* nas lagartas do tratamento “dsRNA *JHEH*” em relação ao controle negativo “HT115 não transformada”, sendo de 78,9% e 74,7% em 3 e 15 dias de alimentação, respectivamente (Figura 24). Apesar da alta redução da expressão de *JHEH* nesses dois períodos, ao se comparar com a mortalidade observada no tratamento “dsRNA *JHEH*”, pode se notar que esse silenciamento gênico induzido pelo dsRNA *JHEH* foi detectado de forma pontual, afetando a mortalidade larval de *T. absoluta* somente em relação ao tratamento “dieta”.

Figura 24. Expressão gênica relativa de lagartas ($n=10$) de *Tuta absoluta* após se alimentarem por 3, 6, 9, 12 e 15 dias em dieta artificial com *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)*. Como gene de referência, foi usado o gene *elongation factor 1-alpha*. O tratamento “dieta + HT115 não transformada” foi utilizado como referência para expressão relativa. *GFP* refere-se ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Com o silenciamento do gene alvo da rota de síntese do ecdisônio, *ecdysteroid 25-hydroxylase (PHM)*, foi constatado aumento de mortalidade da fase larval no tratamento “dsRNA *PHM*” mas não significativo em relação aos controles (Figura 25).

Figura 25. Mortalidade da fase larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA dos genes *ecdysteroid 25-hydroxylase (PHM)*. *GFP* se refere ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pela análise de desvios (GLM, $p < 0,05$).

No parâmetro peso de pupas para o gene *PHM*, também não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos para machos e fêmeas (Tabela 15). Porém, foi observada uma redução significativa do período de duração larval para machos e fêmeas no tratamento “dsRNA *PHM*” em relação aos controles, sendo uma redução em torno de 6 dias para machos e 5 dias para fêmeas.

Tabela 15. Peso de pupas e duração larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *ecdysteroid 25-hydroxylase* (PHM).

Tratamentos	Peso de Pupas (mg) ¹		Duração (dias) ²	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Dieta	3,28 a	4,34 a	29,98 a	29,90 a
Dieta + HT115 não transformada	3,43 a	4,61 a	29,31 a	29,41 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>GFP</i> ³	3,69 a	4,11 a	29,26 a	30,19 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>PHM</i>	3,77 a	4,69 a	23,73 b	25,16 b

¹ colunas seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Macho: $p = 0,048$; Fêmea: $p = 0,232$;

² colunas seguidas pela mesma letra não diferem pela análise dos desvios (GLM, $p < 0,05$). Macho: $p = 2,53 \times 10^{-7}$; Fêmea: $p = 1,72 \times 10^{-6}$;

³ *GFP*: green fluorescence protein.

O acúmulo de transcritos do gene alvo *PHM* foi significativamente reduzido no tratamento “dsRNA *PHM*” em relação ao controle negativo “HT115 não transformada” em 64,7%, 58% e 16,7% nos períodos de 3, 6 e 9 dias de alimentação das lagartas, respectivamente, mas não nos pontos posteriores, 12 e 15 dias (Figura 26).

Figura 26. Expressão gênica relativa de lagartas ($n=10$) de *Tuta absoluta* após se alimentarem por 3, 6, 9, 12 e 15 dias em dieta artificial com *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *ecdysteroid 25-hydroxylase* (PHM). Como gene de referência, foi usado o gene *elongation factor 1-alpha*. O tratamento “dieta + HT115 não transformada” foi utilizado como referência para expressão relativa. *GFP* refere-se ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para o gene alvo *chitin synthase A* (*CHI*), o tratamento “dsRNA *CHI*” apresentou mortalidade igual a 45,6%, sendo significativamente superior aos tratamentos controles (Figura 27).

Figura 27. Mortalidade da fase larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *chitin synthase A (CHI)*. *GFP* se refere ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pela análise de desvios (GLM, $p < 0,05$).

Não foram observadas diferenças para o peso de pupas e duração da fase larval no tratamento “dsRNA *CHI*”, tanto em machos quanto em fêmeas (Tabela 16). Apesar do peso de pupas não ter sido afetado pelo tratamento “dsRNA *CHI*”, foi verificado na coleta de lagartas para análise de expressão gênica com 12 dias, que as lagartas desse tratamento apresentavam tamanho visualmente menor, comparadas aos tratamentos controle (Figura 28).

Tabela 16. Peso de pupas e duração larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *chitin synthase A (CHI)*.

Tratamentos	Peso de Pupas (mg) ¹		Duração (dias) ²	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Dieta	3,66 a	4,68 a	28,35 a	28,05 a
Dieta + HT115 não transformada	3,39 a	4,46 a	29,00 a	28,55 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>GFP</i> ³	3,37 a	4,64 a	29,36 a	29,49 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>CHI</i>	3,43 a	4,43 a	29,14 a	29,37 a

¹ colunas seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Macho: $p = 0,085$; Fêmea: $p = 0,369$;

² colunas seguidas pela mesma letra não diferem pela análise dos desvios (GLM, $p < 0,05$). Macho: $p = 0,385$; Fêmea: $p = 0,576$;

³ *GFP*: *green fluorescence protein*.

Figura 28. Fenótipos apresentados por lagartas de *Tuta absoluta* aos 12 dias, alimentadas com os tratamentos: A- dieta, 10 lagartas com tamanho normal; B – dieta artificial + HT115 não transformada, 10 lagartas com tamanho normal; C - dieta + HT115 dsRNA *GFP*, 10 lagartas com tamanho normal; D - dieta + HT115 dsRNA *chitin synthase A (CHI)*, 10 lagartas com tamanho reduzido; E- detalhe da lagarta com o tamanho representativo do tratamento dieta artificial + HT115 não transformada (esquerda) e dieta + HT115 dsRNA *CHI* (direita).

Ao observar a expressão do gene alvo *chitin synthase A (CHI)* ao longo dos 15 primeiros dias de alimentação das lagartas, observou-se redução significativa da expressão do gene *CHI* no tratamento “dsRNA *CHI*” somente aos 3 dias, sendo esta 27,9% menor do que a expressão no controle negativo “HT115 não transformada” (Figura 29). Apesar da redução da expressão do gene *CHI* ser temporária, verificou-se que esse silenciamento foi efetivo para levar a 45,6% de mortalidade em lagartas de *T. absoluta* tratadas com dsRNA *CHI*.

Figura 29. Expressão gênica relativa de lagartas ($n=10$) de *Tuta absoluta* após se alimentarem por três, seis, nove, doze e quinze dias em dieta artificial com *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *chitin synthase A (CHI)*. Como gene de referência, foi usado o gene *elongation factor 1-alpha*. O tratamento “dieta + HT115 não transformada” foi utilizado como referência para expressão relativa. GFP refere-se ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Para estudar os efeitos do dsRNA de *glutathione S-transferase epsilon 2 (GST)* em lagartas de *T. absoluta*, os tratamentos foram adicionados a dieta artificial convencional e também em dieta acrescida de pó de folhas de tomateiro liofilizadas. Isto foi realizado pois esse gene é relacionado com detoxificação de compostos secundários das plantas (Heckel, 2014).

Na dieta convencional, o tratamento em que as lagartas que se alimentaram de “dsRNA *GST*” não apresentou taxa de mortalidade significativamente diferente aos controles (Figura 30). Porém, quando foi adicionado pó de folhas liofilizadas de tomateiro à dieta, observa-se que no tratamento “dsRNA *GST*” a mortalidade foi maior (44,4%) do que a observada no mesmo tratamento em dieta convencional (26,7%). No entanto, quando se compara o tratamento “dsRNA *GST*” com os outros controles em dieta com folhas de tomate verifica-se que o valor da mortalidade diferiu somente do tratamento “dieta” (25,6%) (Figura 30). Nos parâmetros peso de pupas e duração da fase larval não foram observadas diferenças significativas do tratamento “dsRNA *GST*” para os dois tipos de dieta (Tabela 17 e 18).

Em relação ao acúmulo de transcritos do gene *glutathione S-transferase (GST)*, na dieta convencional, verificou-se que nas lagartas do tratamento “dsRNA *GST*”, em 3 e 6 dias de alimentação, houve acúmulo dos transcritos de *GST*, sendo 234% e 57,5% maior do que o controle negativo “HT115 não transformada”, respectivamente. Observou-se que, nos mesmos períodos houve também um aumento na expressão do gene *GST* no tratamento

“dsRNA *GFP*”, sendo 199% e 44,1% maior do que a do controle negativo “HT115 não transformada”. Nos períodos de alimentação de 9, 12 e 15 dias, no tratamento “dsRNA *GST*” observou-se uma redução significativa nos acúmulos de transcritos de *GST*, sendo 67,6%, 68,2% e 83,1% menor do que a expressão no controle negativo “HT115 não transformada”, respectivamente. Também, aos 9 dias, no tratamento “dsRNA *GFP*” observou-se uma redução significativa do acúmulo de transcritos de *GST* em 61,7% menor do que o controle negativo (Figura 31). Assim, ao se comparar a expressão de *GST* nos primeiros 15 dias de experimento, em dieta convencional, verifica-se que a redução dos transcritos ocorreu em três períodos de alimentação (9, 12 e 15 dias).

Tabela 17. Peso de pupas e duração larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *glutathione S-transferase (GST)*.

Tratamentos	Peso de Pupas (mg) ¹		Duração (dias) ²	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Dieta	3,28 a	4,34 a	29,98 a	29,90 a
Dieta + HT115 não transformada	3,43 a	3,89 a	29,31 a	29,91 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>GFP</i> ³	3,69 a	4,11 a	29,26 a	30,19 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>GST</i>	3,37 a	4,46 a	31,74 a	28,88 a

¹ colunas seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Macho: $p = 0,183$; Fêmea:

$p = 0,157$;

² colunas seguidas pela mesma letra não diferem pela análise dos desvios (GLM, $p < 0,05$). Macho: $p = 0,139$;

Fêmea: $p = 0,708$;

³ *GFP*: green fluorescence protein.

Tabela 18. Peso de pupas e duração larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial com pó de folhas de tomateiro liofilizadas, contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *glutathione s-transferase (GST)*.

Tratamentos	Peso de Pupas (mg) ¹		Duração (dias) ²	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Dieta	3,28 a	4,13 a	32,57 a	30,43 a
Dieta + HT115 não transformada	2,90 a	3,81 a	35,90 a	32,69 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>GFP</i> ³	3,05 a	4,48 a	33,13 a	33,80 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>GST</i>	3,05 a	3,98 a	32,04 a	31,00 a

¹ colunas seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Macho: $p = 0,454$; Fêmea: $p = 0,209$;

² colunas seguidas pela mesma letra não diferem pela análise dos desvios (GLM, $p < 0,05$). Macho: $p = 0,121$;

Fêmea: $p = 0,177$;

³ *GFP*: green fluorescence protein.

Figura 30. Mortalidade da fase larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *glutathione s-transferase epsilon (GST)* (acima) e em dieta contendo folhas de tomateiro liofilizadas (abaixo). *GFP* se refere ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pela análise de desvios (GLM, $p < 0,05$).

Figura 31. Expressão gênica relativa de lagartas (n=10) de *Tuta absoluta* após se alimentarem por 3, 6, 9, 12 e 15 dias com *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *glutathione S-transferase (GST)*. Como gene de referência, foi usado o gene *elongation factor 1-alpha*. O tratamento “dieta + HT115 não transformada” foi utilizado como referência para expressão relativa. *GFP* refere-se ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em dieta com pó de folhas de tomateiro liofilizadas, observou-se que a redução na expressão de *glutathione S-transferase (GST)* nas lagartas do tratamento “dsRNA *GST*” de 65,6%, 57,4 %, 47,8%, 63,4% e 73,1% em relação ao controle negativo, nos períodos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias de alimentação, respectivamente. Observou-se também uma redução de transcritos de *GST* no tratamento “dsRNA *GFP*”, nos períodos de 3, 12 e 15 dias, em 35,2%, 33,6% e 11,6% menor do que o controle negativo, respectivamente (Figura 32).

Diferentemente do que ocorreu em dieta convencional, o tratamento com dsRNA *GST* em dieta contendo folhas de tomateiro, obteve reduções significativas do acúmulo de transcritos de *GST*, que foi efetiva para afetar a mortalidade no tratamento “dsRNA *GST*” (44,4%) quando comparado com o tratamento “dieta” (25,6%).

Figura 32. Expressão gênica relativa de lagartas ($n=10$) de *Tuta absoluta* após se alimentarem por 3, 6, 9, 12 e 15 dias em dieta contendo folhas de tomateiro e *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *glutathione S-transferase* (GST). Como gene de referência, foi usado o gene *elongation factor 1-alpha*. O tratamento “dieta + HT115 não transformada” foi utilizado como referência para expressão relativa. GFP refere-se ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Para estudar os efeitos do dsRNA do gene *carboxylesterase* (COE) em lagartas de *T. absoluta*, também foram testadas a dieta convencional e a dieta acrescida de pó de folhas de tomateiro liofilizadas. Em lagartas de *T. absoluta* alimentadas com o tratamento dsRNA COE observou-se mortalidade significativamente maior (48,9%) em relação aos tratamentos controles “dieta” (24,4%), “HT115 não transformada” (26,7%) e “dsRNA GFP” (28,9%) (Figura 33). Porém, em dieta contendo folhas de tomateiro, para o tratamento “dsRNA COE” não foi verificado aumento da mortalidade da fase larval (Figura 33). Em dieta convencional, o peso de pupas de machos não apresentou diferenças entre “dsRNA COE” e os tratamentos (Tabela 19). Para o peso de pupas das fêmeas, verificou-se uma diminuição no tratamento “HT115 não transformada” em comparação ao tratamento “dieta” (Tabela 19). No entanto, não houve diferenças estatísticas no peso de pupas de fêmeas nos tratamentos “dsRNA GFP” e “dsRNA COE” quando comparados com os tratamentos “HT115 não transformada” e “dieta”. Em relação à duração da fase larval, no tratamento “dsRNA COE” houve uma redução em torno de 5 dias para machos e fêmeas em relação aos demais tratamentos (Tabela 19).

Figura 33. Mortalidade da fase larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *carboxylesterase* (COE) (acima) e em dieta contendo pó de folhas de tomateiro (abaixo). *GFP* se refere ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pela análise de desvios (GLM, $p < 0,05$).

Tabela 19. Peso de pupas e duração larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *carboxylesterase* (COE).

Tratamentos	Peso de Pupas (mg) ¹		Duração (dias) ²	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Dieta	3,28 a	5,23 a	29,98 a	29,90 a
Dieta + HT115 não transformada	3,43 a	4,61 b	29,31 a	29,41 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>GFP</i> ³	3,69 a	4,79 ab	29,24 a	30,19 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>COE</i>	3,69 a	4,72 ab	24,45 b	25,13 b

¹ colunas seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Macho: $p = 0,117$; Fêmea: $p = 0,039$;

² colunas seguidas pela mesma letra não diferem pela análise dos desvios (GLM, $p < 0,05$). Macho: $p = 1,11 \times 10^{-5}$; Fêmea: $p = 2,09 \times 10^{-5}$;

³ *GFP*: green fluorescence protein.

Em dieta artificial com folhas de tomateiro não foi observado diferenças no peso de pupas de machos entre os tratamentos (Tabela 20). Inesperadamente, verificou-se uma pequena diminuição no peso de pupas de fêmeas no tratamento “HT115 não transformada” em comparação aos tratamentos “dsRNA *GFP*” e “dsRNA *COE*”, porém essa diferença não é significativa quando comparada ao tratamento “dieta” (Tabela 20).

Em relação à duração da fase larval, em dieta artificial contendo folhas de tomateiro, para machos, o tratamento “dsRNA *COE*” apresentou uma redução em torno de 10 dias em relação ao tratamento “HT115 não transformada” e em torno de 7 dias para “dsRNA *GFP*” e “dieta”. Nas fêmeas, no tratamento “dsRNA *COE*”, também houve redução da duração da fase larval em torno de 8 dias em comparação a “dsRNA *GFP*”, 6 dias em comparação a “HT115 não transformada” e 4 dias em comparação a “dieta” (Tabela 20).

Tabela 20. Peso de pupas e duração larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial com pó de folhas de tomateiro liofilizadas, contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *carboxylesterase* (COE).

Tratamentos	Peso de Pupas (mg) ¹		Duração (dias) ²	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Dieta	3,28 a	4,13 ab	32,57 a	30,43 a
Dieta + HT115 não transformada	2,90 a	3,81 b	35,90 a	32,69 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>GFP</i> ³	3,05 a	4,68 a	33,13 a	34,56 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>COE</i>	3,43 a	4,77 a	25,38 b	26,10 b

¹ colunas seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Macho: $p = 0,079$; Fêmea: $p = 0,009$;

² colunas seguidas pela mesma letra não diferem pela análise dos desvios (GLM, $p < 0,05$). Macho: $p = 1,2 \times 10^{-16}$; Fêmea: $p = 2,93 \times 10^{-6}$;

³ *GFP*: green fluorescence protein.

Na avaliação do acúmulo de transcritos do gene *COE*, na dieta convencional, verificou-se que lagartas do tratamento “dsRNA *COE*”, aos 3, 9 e 12 dias de alimentação, apresentaram redução significativa de transcritos de *COE* em 22,2%, 47,9% e 70,7% respectivamente, em comparação ao controle negativo “HT115 não transformada”. Aos 6 dias, houve um acúmulo significativo de transcritos *COE*, 17,6% maior no tratamento “dsRNA *COE*” do que no controle negativo (Figura 34). Já na dieta acrescida com pó de folhas de tomateiro, verificou-se que lagartas do tratamento “dsRNA *COE*” apresentaram redução significativa de transcritos de *COE* em 82,2%, 33,4%, 72,2%, 36,2% e 34,1% aos 3, 6, 9, 12 e 15 dias de alimentação, respectivamente, em comparação ao controle negativo “HT115 não transformada”. Observou-se também uma redução de transcritos de *COE* no tratamento “dsRNA *GFP*”, nos períodos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias, de 69,9%, 35,6%, 60,2%, 33,3% e 62,4% menor do que o controle negativo, respectivamente (Figura 35).

Ao analisar conjuntamente a redução significativa dos transcritos de *COE*, em dieta artificial convencional, com a mortalidade (48,9%), verificou-se que o tratamento dsRNA *COE* foi eficaz na redução do desenvolvimento de lagartas de *T. absoluta*. Porém, em dieta contendo folhas de tomateiro, ao analisar conjuntamente a redução significativa dos transcritos de *COE* com a mortalidade não significativa na fase larval (38,9%), verificou-se que o tratamento “dsRNA *COE*” não foi eficaz na redução do desenvolvimento de lagartas de *T. absoluta*.

Figura 34. Expressão gênica relativa de lagartas ($n=10$) de *Tuta absoluta* após se alimentarem por 3, 6, 9, 12 e 15 dias em dieta artificial com *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *carboxylesterase* (*COE*). Como gene de referência, foi usado o gene *elongation factor 1-alpha*. O tratamento “dieta + HT115 não transformada” foi utilizado como referência para expressão relativa. GFP refere-se ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Figura 35. Expressão gênica relativa de lagartas ($n=10$) de *Tuta absoluta* após se alimentarem por 3, 6, 9, 12 e 15 dias em dieta artificial com pó de folhas de tomateiro e *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *carboxylesterase* (COE). Como gene de referência, foi usado o gene *elongation factor 1-alpha*. O tratamento “dieta + HT115 não transformada” foi utilizado como referência para expressão relativa. GFP refere-se ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Para o gene alvo *alkaline phosphatase* (AP) em lagartas de *T. absoluta*, os tratamentos também foram adicionados a dieta convencional e em dieta acrescida de pó de folhas de tomateiro liofilizadas. As lagartas de *T. absoluta*, alimentadas em dieta convencional no tratamento “dsRNA *alkaline phosphatase*” (dsRNA AP) apresentaram significativo aumento da mortalidade (52,2%) em relação aos tratamentos controles (Figura 36). Porém, quando as lagartas de *T. absoluta* foram alimentadas em dieta contendo folhas de tomateiro, o tratamento “dsRNA AP” não apresentou alteração na mortalidade das lagartas (Figura 36).

Ao analisar o peso de pupas de machos e de fêmeas em dieta convencional, o tratamento “dsRNA AP” não apresentou diferenças entre os demais (Tabela 21). Em relação à duração da fase larval, para machos, não foram encontradas diferenças significativas entre tratamentos, porém, para fêmeas, o tratamento “dsRNA AP” apresentou uma redução em torno de 3,5 dias em relação aos tratamentos “dieta” e “HT115 não transformada” (Tabela 21). Já em dieta contendo folhas de tomateiro, o peso de pupas de machos e fêmeas foi menor em “HT115 não transformada” do que em “dsRNA AP”, porém essa diferença não foi significativa quando comparada aos tratamentos “dieta” e “HT115: dsRNA GFP” (Tabela 22). Em relação à duração da fase larval, para o tratamento “dsRNA AP”, machos e fêmeas apresentaram uma redução em torno de 9 dias em relação ao tratamento “HT115 não transformada” e 7 dias em relação a “dsRNA GFP”. Já o tratamento “dsRNA AP” em relação

ao tratamento “dieta”, os machos apresentaram uma redução de 6 dias e fêmeas de 5 dias (Tabela 22).

Figura 36. Mortalidade da fase larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *alkaline phosphatase* (AP) (acima) e em dieta contendo pó de folhas de tomateiro (abaixo). *GFP* se refere ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pela análise de desvios (GLM, $p < 0,05$).

Tabela 21. Peso de pupas e duração larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *alkaline phosphatase* (AP).

Tratamentos	Peso de Pupas (mg) ¹		Duração (dias) ²	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Dieta	3,28 a	4,34 a	29,98 a	29,90 a
Dieta + HT115 não transformada	3,43 a	4,61 a	29,31 a	29,41 ab
Dieta + HT115: dsRNA <i>GFP</i> ³	3,69 a	4,11 a	29,26 a	30,19 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>AP</i>	3,53 a	4,34 a	27,71 a	26,27 b

¹ colunas seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Macho: $p = 0,206$; Fêmea: $p = 0,544$;

² colunas seguidas pela mesma letra não diferem pela análise dos desvios (GLM, $p < 0,05$). Macho: $p = 0,224$; Fêmea: $p = 0,025$;

³ *GFP*: green fluorescence protein.

Tabela 22. Peso de pupas e duração larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial com dieta com pó de folhas de tomateiro, contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *alkaline phosphatase* (AP).

Tratamentos	Peso de Pupas (mg) ¹		Duração (dias) ²	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Dieta	3,28 ab	4,13 ab	32,57 a	30,43 a
Dieta + HT115 não transformada	2,90 b	3,81 b	35,90 a	32,69 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>GFP</i> ³	3,05 ab	4,68 ab	33,13 a	34,56 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>AP</i>	3,58 a	4,81 a	26,12 b	25,63 b

¹ colunas seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Macho: $p = 0,013$; Fêmea: $p = 0,007$;

² colunas seguidas pela mesma letra não diferem pela análise dos desvios (GLM, $p < 0,05$). Macho: $p = 5,26 \times 10^{-14}$; Fêmea: $p = 1,82 \times 10^{-7}$;

³ *GFP*: green fluorescence protein.

Em relação à análise do acúmulo de transcritos do gene *alkaline phosphatase* (AP), na dieta convencional, verifica-se que as lagartas do tratamento “dsRNA AP”, aos 3, 9 e 15 dias de alimentação, apresentaram redução dos transcritos de AP em 50,1%, 31,3% e 49,1%, respectivamente, em comparação ao controle negativo “HT115 não transformada”. Observou-se também uma redução de transcritos de AP no tratamento “HT115: dsRNA *GFP*” de 24,8% quando comparado ao controle negativo “HT115 não transformada”, no período de 3 dias após a inoculação das lagartas (Figura 37). Ao analisar conjuntamente, a redução significativa do acúmulo de transcritos AP com o aumento da mortalidade (52,2%), verificou-se que o silenciamento gênico induzido pelo dsRNA AP, em dieta convencional, foi efetivo sobre a redução do desenvolvimento de lagartas de *T. absoluta*.

Figura 37. Expressão gênica relativa de lagartas ($n=10$) de *Tuta absoluta* após se alimentarem por 3, 6, 9, 12 e 15 dias em dieta artificial com *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *alkaline phosphatase* (AP). Como gene de referência, foi usado o gene *elongation factor 1-alpha*. O tratamento “dieta + HT115 não transformada” foi utilizado como referência para expressão relativa. GFP refere-se ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Em relação ao gene *alkaline phosphatase* (AP), na dieta contendo folhas de tomate, verificou-se que nas lagartas do tratamento “dsRNA AP” aos 3 e 15 dias de alimentação, redução dos transcritos de AP, em 54% e 56,6%, respectivamente, em comparação ao controle negativo “HT115 não transformada”. Aos 6 dias de alimentação das lagartas do tratamento “dsRNA AP”, foi constatado um aumento significativo dos transcritos AP, 18% maior do que o controle negativo “HT115 não transformada”. Observou-se também uma redução de transcritos de AP no tratamento “dsRNA GFP” em 38% quando comparado ao controle negativo “HT115 não transformada”, aos 3 dias de alimentação das lagartas (Figura 38).

Ao analisar conjuntamente a expressão gênica de AP, ao longo dos 15 dias de experimento, com a mortalidade não significativa do tratamento “dsRNA AP”, em dieta com pó de folhas de tomateiro liofilizadas, pode-se inferir que o silenciamento gênico induzido pelo dsRNA AP observado aos 3 e 15 dias não foi efetivo para afetar a mortalidade de *T. absoluta*.

Figura 38. Expressão gênica relativa de lagartas ($n=10$) de *Tuta absoluta* após se alimentarem por 3, 6, 9, 12 e 15 dias em dieta artificial com pó de folhas de tomateiro e *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *alkaline phosphatase* (AP). Como gene de referência, foi usado o gene *elongation factor 1-alpha*. O tratamento “dieta + HT115 não transformada” foi utilizado como referência para expressão relativa. GFP refere-se ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

A maior mortalidade larval foi verificada no tratamento “dsRNA *arginine kinase*” (dsRNA AK), com valor de 72,2% (Figura 39).

Figura 39. Mortalidade da fase larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *arginine kinase* (AK). GFP se refere ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pela análise de desvios (GLM, $p<0,05$).

Para o parâmetro peso de pupas não foram observadas diferenças entre o tratamento “dsRNA *AK*” em comparação aos demais tratamentos, para machos e fêmeas (Tabela 23). Em relação à duração da fase larval, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos nas fêmeas. Porém, para machos, foi observada uma redução significativa da fase larval, em torno de 4 dias, em relação aos outros tratamentos (Tabela 23).

Tabela 23. Peso de pupas e duração larval de *Tuta absoluta* após se alimentarem de dieta artificial contendo *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *arginine kinase* (*AK*).

Tratamentos	Peso de Pupas (mg) ¹		Duração (dias) ²	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Dieta	3,28 a	4,34 a	29,98 a	29,90 a
Dieta + HT115 não transformada	3,43 a	4,61 a	29,31 a	29,41 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>GFP</i> ³	3,69 a	4,11 a	29,26 a	30,19 a
Dieta + HT115: dsRNA <i>AK</i>	3,74 a	4,67 a	25,39 b	25,67 a

¹ colunas seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Macho: $p = 0,097$; Fêmea: $p = 0,469$;

² colunas seguidas pela mesma letra não diferem pela análise dos desvios (GLM, $p < 0,05$). Macho: $p = 0,001$; Fêmea: $p = 0,139$;

³ *GFP*: green fluorescence protein.

Ao observar o acúmulo de transcritos do gene alvo *AK* ao longo dos 15 primeiros dias de alimentação das lagartas, observou-se que houve uma redução significativa da expressão do *AK* no tratamento “dsRNA *AK*” somente aos 3 e 6 dias, sendo 34,6% e 39,1%, respectivamente, menor do que a expressão no controle negativo “HT115 não transformada”. Observou-se também uma redução de 10% no acúmulo de transcritos de *AK* no tratamento “dsRNA *GFP*” quando comparado ao controle negativo “HT115 não transformada”, em 3 dias de alimentação das lagartas (Figura 40). Apesar da redução da expressão do gene *AK* ser limitada, verificou-se que esse silenciamento gênico foi efetivo para causar 72,2% de mortalidade em lagartas de *T. absoluta* tratadas com dsRNA *AK*.

Figura 40. Expressão gênica relativa de lagartas ($n=10$) de *Tuta absoluta* após se alimentarem por 3, 6, 9, 12 e 15 dias em dieta artificial com *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene *arginine kinase* (AK). Como gene de referência, foi usado o gene *elongation factor 1-alpha*. O tratamento “dieta + HT115 não transformada” foi utilizado como referência para expressão relativa. GFP refere-se ao gene *green fluorescence protein*. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). Colunas seguidas de letras iguais não diferiram pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Lagartas de *T. absoluta* que se alimentaram de dieta artificial, contendo *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA dos genes *arginine kinase* (AK), *alkaline phosphatase* (AP), *carboxylesterase* (COE), *chitin synthase A* (CHI) e *juvenile hormone inducible protein* (JHP) apresentaram aumento na mortalidade na fase larval, sendo efetivo o silenciamento gênico por RNAi desse genes.

3.4. Discussão

Para desenvolver um sistema de RNAi, que seja aplicável como estratégia de controle de insetos-pragas, é necessário inicialmente desenvolver uma metodologia robusta de *screening* de genes alvos de silenciamento que garanta a entrega de dsRNA de maneira eficiente e que permita a avaliação dos efeitos do silenciamento gênico sobre o desenvolvimento do inseto alvo. Sendo assim, este trabalho buscou uma metodologia de fornecimento de dsRNA a lagartas de *Tuta absoluta*, que fosse eficiente, que permitisse a avaliação do silenciamento de um maior número de genes alvos e que facilitasse a avaliação dos efeitos do silenciamento sobre o desenvolvimento do inseto.

Apesar da maioria dos trabalhos sobre os efeitos de silenciamento por RNAi em genes de diversos insetos-pragas utilizar dieta artificial (Terenius et al., 2011; Zhang et al., 2012; Wang et al., 2015; Camargo et al., 2016; Fishilevich et al., 2016), para *T. absoluta* não havia

uma dieta artificial com viabilidade (ovo-adulto) maior ou igual a 75% (Bajonero e Parra, 2017), requerimento mínimo para uma dieta ser considerada adequada para produção de insetos em laboratório (Singh, 1983). Por esse motivo, nos primeiros trabalhos com RNAi em *T. absoluta* foi utilizada uma metodologia baseada no uso de folíolos de tomateiros destacados de plantas, onde os pecíolos eram imersos em solução com dsRNA sintetizado *in vitro* para a absorção (Camargo, 2014; Camargo et al., 2015; Camargo et al., 2016). A metodologia de folíolos de tomateiro destacados com prévia absorção de solução com dsRNA foi utilizada também com sucesso para obter silenciamento de genes da rota do ecdisônio em *Bemisia tabaci* (Luan et al., 2013).

Dessa maneira, primeiramente utilizou-se nesse trabalho a metodologia de folíolos de tomateiro destacados (Camargo, 2014; Camargo et al., 2015; Camargo et al., 2016). Apesar dessa metodologia ter apresentado resultados satisfatórios em trabalhos prévios, nas condições desse trabalho ela não demonstrou bons resultados, não apresentando silenciamento para *T. absoluta* nos genes avaliados. Essa técnica apresenta alguns empecilhos para sua padronização visando o *screening* de um grande número de genes, tais como: ser dependente de plantas de tomateiro livres de doenças para utilização de folíolos; não permitir isolar o efeito da planta sobre o efeito do tratamento com RNAi, sendo dependente da turgidez dos folíolos. Então, buscou-se adequar uma nova metodologia para *screening* de genes, sendo possível com a disponibilização de uma dieta artificial para *T. absoluta* que apresentasse viabilidade (ovo-adulto) de 75% (Bajonero e Parra, 2017). A maioria dos trabalhos que utilizam dieta artificial, fazem uso de dsRNA sintetizado *in vitro* (Turner et al., 2006; Bautista et al., 2009; Yang et al., 2010; Khajuria et al., 2010; Upadhyay et al., 2011; Asokan et al., 2014; Galdeano et al., 2017). Porém, a síntese de dsRNA *in vitro* é um método caro, dependente de kits de transcrição e necessita de muitas reações para se alcançar doses altas de dsRNA. Além disso, para insetos da Ordem Lepidoptera, que apresentam difícil resposta ao mecanismo de RNAi (Terenius et al., 2011), tem sido proposto métodos de entrega que protejam a molécula de dsRNA, como o uso de bactérias transformadas que expressem dsRNA, garantindo eficiência no teste de genes alvos, com baixa degradação da molécula (Tian et al., 2009; Yang e Han., 2014). A dieta artificial para *T. absoluta* (Bajonero e Parra, 2017) facilitou a utilização do método de entrega de dsRNA com bactérias que expressem dsRNA de interesse, como *Escherichia coli* HT115 (DE3). Além disso, possibilitou a avaliação do silenciamento de diversos genes de *T. absoluta*, facilitando a avaliação visual de parâmetros de desenvolvimento de *T. absoluta*, ao longo de toda a fase larval, pois as lagartas

não estavam protegidas dentro das folhas de tomateiro e o seu desenvolvimento não era mais em folhas sadias provenientes de produção de plantas de tomateiro em casa-de-vegetação.

Os genes alvos de *T. absoluta* foram escolhidos dentro de categorias gênicas distintas, considerando a essencialidade no desenvolvimento de artrópodes. As categorias escolhidas com os respectivos genes clonados com sucesso foram: síntese e degradação do Hormônio Juvenil (*juvenile hormone inducible protein* - *JHP* e *juvenile hormone epoxide hydrolase protein* - *JHEH*); síntese do ecdisônio (*ecdysteroid 25-hydroxylase* – *PHM*); síntese de componentes estruturais de tecido de revestimento do inseto (*chitin synthase A* – *CHI* e *insect intestinal mucin precursor* - *MUCIN*); detoxificação de compostos (*glutathione S-transferase epsilon 2* – *GST* e *carboxylesterase* - *COE*); envolvimento na síntese de proteínas de transporte presentes nas células do mesêntero dos insetos (*alkaline phosphatase* - *AP*) e; síntese da enzima arginina quinase, fundamental no metabolismo energético celular (*arginine kinase* - *AK*). Os genes *JHP*, *MUCIN*, *GST*, *COE* e *AP*, além de estarem ligados a processos metabólicos essenciais citados acima, foram diferencialmente expressos na fase larval em relação à fase de ovo e adulto, na análise de RNA_seq do transcrito de *T. absoluta* (Camargo et al., 2015).

Na análise de especificidade dos genes de *T. absoluta*, utilizados nesse trabalho, observou-se que nenhuma das sequências apresenta 100% de identidade com sequências maiores ou iguais a 21 nucleotídeos (nt) de *Homo sapiens* e *Solanum lycopersicum*. Com relação aos genes que apresentaram 100% de identidade maior ou igual a 21nt com alguma espécie, verificou-se que nenhuma dessas pertencem ao grupo dos inimigos naturais ou de espécies que se alimentem ou interajam com a teia ecológica de *T. absoluta* ou do sistema agrícola em que este inseto-praga está inserido. Embora existam evidências de que análises de especificidade por banco de dados (por exemplo, Blast) possam reduzir testes *in vivo* com organismos não alvos (Fishilevich et al., 2016), para a comprovação de que essas sequências de *T. absoluta* não apresentem *off-targets* com outros insetos, testes adicionais devem ser realizados em trabalhos futuros. Nesses testes, deve haver o oferecimento de dsRNAs dessas sequências gênicas a espécies de insetos da Ordem Lepidoptera e inimigos naturais. Espécies de besouro *Diabrotica undecimpunctata howardii* e *Leptinotarsa decemlineata* alimentadas com dieta contendo dsRNA de sequências órtologas dos genes *V-ATPase A* e *E* de *Diabrotica virgifera* apresentaram mortalidade larval significativa (Baum et al., 2007). As sequências dos genes órtologos de *L. decemlineata* foram clonadas e comparadas com as de *D. virgifera* e apresentaram 83% e 79% de sequências nucleotídicas idênticas para os genes *V-ATPase A* e *E*, respectivamente. O espectro da atividade do dsRNA do gene *Snf7* (240 nucleotídeos) foi

testado para espécies de insetos filogeneticamente relacionados. Os resultados demonstram que o espectro de atividade para dsRNA $Snf7$ é estreito e só é evidente em um subconjunto de besouros dentro da subfamília Galerucinae de Chrysomelidae (Bachman et al., 2013).

A clonagem dos genes, a partir de Mix de cDNA dos quatro ínstares larvais de *T. absoluta*, foi realizada com sucesso para oito dos dez genes escolhidos. O sequenciamento seguido de Blastx e alinhamento confirmaram que as sequências gênicas de *T. absoluta* apresentam grande similaridade com sequências de aminoácidos de insetos da Ordem Lepidoptera.

Os genes *JHEH*, *PHM* e *MUCIN* foram testados, utilizando a metodologia de folíolos de tomateiros destacados de plantas, onde os pecíolos foram imersos em solução com dsRNA sintetizado *in vitro* para a absorção e não apresentaram silenciamento gênico.

Na metodologia em que se utiliza dieta artificial e *E. coli* HT115 expressando dsRNA, os genes *JHP*, *JHEH*, *PHM*, *CHI*, *GST*, *COE*, *AP* e *AK* foram testados. Para o gene *MUCIN* não foi obtido sucesso na clonagem em plasmídeo L4440, e por esse motivo não foram conduzidos testes com este gene. O gene *AK* já havia sido testado e apresentado bons resultados quando utilizado como gene alvo de silenciamento (Camargo, 2014; Camargo et al., 2016 e Bento et al., 2016). Assim, o gene *AK* teve também a função de um gene controle positivo da metodologia utilizada nesse trabalho.

Para o gene alvo *juvenile hormone inducible protein (JHP)*, verificou-se que o tratamento com dsRNA *JHP* foi eficaz no silenciamento desse gene em *Tuta absoluta* pois reduziu significativamente os transcritos de *JHP* durante 15 dias de alimentação das lagartas e levou ao aumento significativo da mortalidade na fase larval. De maneira semelhante, valores significativos na mortalidade de lagartas de *Helicoverpa armigera* foram observados quando alimentadas com plantas transgênicas de algodão expressando dsRNA do gene *juvenile hormone binding protein*, gene esse também envolvido na rota do Hormônio Juvenil (JH) (Ni et al., 2017). Nas lagartas de *T. absoluta* mortas no tratamento com dsRNA *JHP* foi observado um fenótipo típico, de cápsula cefálica reduzida e exoesqueleto antigo preso na porção final do corpo. Esse fenótipo foi semelhante aos encontrados em larvas de *Tribolium castaneum* que receberam, por microinjeção, dsRNA do gene *JH-inducible Krüppel* homolog 1 (*Kr-h1*), as quais permaneceram presas ao antigo tegumento, sofrendo metamorfose precoce para a fase de pupa, demonstrando a função do *Kr-h1* na regulação hormonal do JH e do ecdisônio em larvas de *T. castaneum* (Minakuchi et al., 2009). Apesar do silenciamento do gene *JHP* não ter sido ainda relatado em lepidópteros, os resultados obtidos em *T. absoluta*

levam esse gene a ser considerado efetivo e promissor para aplicação como estratégia de controle de insetos-pragas.

Já para o gene *juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)*, o tratamento de dsRNA *JHEH* não foi efetivo para afetar a mortalidade de *T. absoluta*, apesar de ser verificado redução no acúmulo dos transcritos de *JHEH* nas lagartas com 3 e 15 dias de alimentação. Porém, o tratamento dsRNA *JHEH* levou a diminuição da duração da fase larval de machos e fêmeas, podendo indicar um desbalanço no JH causado pela redução do acúmulo dos transcritos de *JHEH* circulante na hemolinfa do inseto. A degradação do JH é um mecanismo importante para a regulação do título de JH na hemolinfa do inseto, com grande atuação das enzimas *juvenile hormone esterase* e *juvenile hormone epoxide hydrolase* (Kontogiannatos et al., 2016).

O tratamento de dsRNA *ecdysteroid 25-hydroxylase (PHM)* *PHM* apesar de reduzir a expressão do gene *PHM* nos três primeiros períodos de alimentação (3, 6 e 9 dias), não foi suficiente para afetar a mortalidade de *T. absoluta*. Ninfas do ortóptero *Schistocerca gregaria* microinjetadas com dsRNA do gene *PHM* também apresentaram redução do acúmulo dos transcritos do gene *PHM*, porém a mortalidade dessas ninfas não foi descrita (Marchal et al., 2011). Semelhante ao gene *JHEH*, o tratamento com dsRNA *PHM* reduziu significativamente o período de duração larval para machos e fêmeas em relação aos tratamentos controles. A redução do período larval pode indicar uma diminuição do título da enzima *ecdysteroid 25-hydroxylase* circulante na hemolinfa do inseto pelo tratamento com dsRNA *PHM*. Esta redução pode acarretar em diminuição da síntese de hormônio ecdisônio, visto que essa tem papel fundamental na síntese do hormônio que controla a ecdise (Dinan e Hormann, 2005).

Em relação ao gene alvo *chitin synthase A (CHI)*, o tratamento com dsRNA *CHI* foi efetivo em aumentar a mortalidade de *T. absoluta*, com redução do acúmulo dos transcritos somente no início de alimentação (3 dias). Esses resultados corroboram com os encontrados em lagartas de *Spodoptera exigua* que se alimentaram em dieta artificial contendo bactérias *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA gene *chitin synthase A (SeCHSA)* (Tian et al., 2009). Foi observada mortalidade superior neste tratamento em comparação ao controle, bem como redução da expressão do gene *SeCHSA*. Também, o aumento da mortalidade e da redução da expressão do gene *SeCHSA* em *S. exigua* foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de bactérias HT115 expressando dsRNA *SeCHSA* na dieta, obtendo melhores resultados quando administrada maior concentração de células bacterianas expressando dsRNA em comparação à doses médias e baixas. A alta dose considerada foi de 5X e 25X superior que as concentrações média e baixa, respectivamente (Tian et al., 2009). Em

Diaphorina citri, adultos alimentados com dieta artificial contendo solução com dsRNA de *chitin synthase* (CS) apresentaram aumento significativo na mortalidade de 15% e 34% após 96 e 120 h de alimentação, respectivamente, e redução do acúmulo dos transcritos de CS 120h após alimentação (Galdeano et al., 2017). Também foi verificado que ninfas de *D. citri* alimentadas com folhas de *Citrus* que absorveram solução de dsRNA CS apresentaram aumento na mortalidade após 7 e 11 dias de alimentação, sendo confirmada redução significativa dos transcritos de CS com 11 dias de alimentação das ninfas (Galdeano et al., 2017). Em *Leptinotarsa decemlineata* verificou-se que a diminuição dos transcritos de *chitin synthase* (*ChS*) é muito variável em razão do ínstar larval, no entanto o silenciamento de *ChS* também aumentou a mortalidade de larvas (Shi et al., 2016). Em *H. armigera*, lagartas que se alimentaram de plantas de tabaco com cloroplasto transformado para expressar dsRNA do gene *chitin synthase* apresentaram mortalidade de 53,3% (Jin et al., 2015). O fenótipo de redução do tamanho das lagartas de *T. absoluta*, foi encontrado também em larvas de *L. decemlineata* que se alimentaram de dieta contendo bactéria HT115 expressando dsRNA de *chitin synthase* B (Shi et al., 2016) porém, diferentemente de *T. absoluta*, nesse caso houve também redução do peso de pupas. Uma possível explicação para a não redução do peso de pupas em *T. absoluta* pode ser atribuída a redução dos transcritos ter sido pontual e somente no início do período larval (3 dias de alimentação), podendo ser notado o fenótipo somente aos 12 dias de alimentação. Após esse período, as lagartas que sobreviveram ao tratamento com dsRNA *CHI*, não apresentaram contínua redução dos transcritos, conseguiram se alimentar e atingiram o peso de pupas como as dos tratamentos controles. Assim, em trabalhos futuros, concentrações maiores de bactérias HT115 (DE3) expressando dsRNA *CHI* devem ser testadas, com o objetivo de observar mortalidade superior as encontradas nesse trabalho, maior redução do acúmulo de transcritos, como observado em *S. exigua* (Tian et al., 2016) e se o fenótipo de redução do tamanho de lagartas de *T. absoluta* poderia afetar o peso de pupas, conforme o observado em *L. decemlineata* (Shi et al., 2016). A eficiência demonstrada no silenciamento do gene *CHI* em afetar a mortalidade de insetos de diversas Ordens, somada ao fato que a enzima *chitin synthase* é ausente em vertebrados e plantas, acentua o potencial da utilização do silenciamento desse gene no controle de insetos-pragas.

Para o gene *glutathione S-transferase epsilon 2* (*GST*) foi observado que o tratamento de dsRNA *GST* aumentou a mortalidade de *T. absoluta* e reduziu o acúmulo dos transcritos de *GST* em todos os períodos avaliados somente quando disponibilizado aos insetos na dieta com pó de folhas de tomateiro liofilizadas. Esse fato pode estar relacionado com o papel do gene *GST* na detoxificação de compostos tóxicos das plantas (Mao et al.,

2007; Heckel, 2014). Plantas de tomate possuem diversos compostos tóxicos com efeitos sobre insetos, sendo tomatina, rutina e ácido clorogênico os principais (Bloem et al. 1989; Osier et al., 1996; Traugott e Stamp, 1997). Em lagartas de *H. armigera* em que a dieta artificial foi suplementada com solução de gossipol e butóxido de piperonilo (inibidor de monooxigenases P450) foi observada redução drástica no crescimento e na viabilidade larval (Mao et al., 2007). Também foi observada redução da expressão do gene *GST* e *CYP6AE14* no mesêntero de lagartas, quando essas foram alimentadas com plantas de *Arapidopsis thaliana* expressando dsRNA *GST* e dsRNA *CYP6AE14*. Ninfas de *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) injetadas com dsRNA de dois genes *GST* (*NIGSTe1* – subclasse epsilon e *NIGSTm2* – atividade microssomal) apresentaram redução nos transcritos de *NIGSTe1* de 90% em 24 h e de 80% em 48h, e nos transcritos de *NIGSTm2* de 60% a 24h e 90% a 48h (Zhou et al., 2013). O silenciamento desses dois genes não resultou em aumento da mortalidade das ninfas, mas foi observado que ninfas tratadas com dsRNAs dos dois genes *GST* apresentaram maior sensibilidade ao inseticida organofosforado clorpirifós, aumentando a mortalidade das ninfas de quarto ínstar pelo inseticida em 60% quando *NIGSTe1* foi silenciado, e em 30% quando *NIGSTm2* foi silenciado. Esse estudo forneceu evidências do envolvimento dos genes *GST* da subclasse Epsilon e *GSTs* microssomal na tolerância de *N. lugens* ao inseticida clorpirifós. Para verificar a função do gene *gluthatione S- transferase epsilon1* (*SlGSTe1*) na detoxificação de compostos tóxicos presentes nas folhas de *Brassica juncea*, lagartas de quinto ínstar de *Spodoptera litura* foram injetadas com dsRNA *SlGSTe1*. Com isso a expressão de *SlGSTe1* começou a diminuir 24 h após a microinjeção e houve redução do peso larval (Zou et al., 2016).

Ao contrário do aumento da mortalidade de *T. absoluta* que ocorreu quando lagartas foram alimentadas com dieta artificial acrescidas de pó de folhas de tomateiro liofilizadas e tratamento com dsRNA *GST*, para o gene *carboxylesterase* (*COE*) e *alkaline phosphatase* (*AP*) a mortalidade de *T. absoluta* foi significativa somente nos tratamentos com dsRNA *COE* e *AP* em dieta convencional. Diferentemente do gene *GST*, esses resultados, indicam que os genes *COE* e *AP* não estão ligados a detoxificação de compostos secundários encontrados nas plantas de tomateiro. O gene *COE* é referenciado com a detoxificação de moléculas inseticidas (Vaughan e Hemingway, 1995; Karunaratne et al., 1999; Bizzaro et al., 2005). O aumento da viabilidade da fase larval, quando o pó de folhas de tomateiro foi acrescentado à dieta artificial, pode indicar que compostos secundários encontrados nas folhas de tomateiro estão sendo detoxificados por outros genes (*GSTs*, por exemplo, que não está sendo silenciados nesse caso) e utilizados pelas lagartas de *T. absoluta* para seu desenvolvimento.

Esse fato pode estar ligado ao mecanismo de “sequestro” onde a estratégia de detoxificação de compostos tóxicos da planta pode ser ligada ao mecanismo de sequestro de moléculas, produtos da degradação desses compostos, para utilização em seu benefício, permitindo o sucesso evolutivo dos insetos herbívoros (Heckel, 2014). A diminuição do acúmulo dos transcritos do gene *COE* e *AP* foi observada nos tratamentos com dsRNA *COE* e *AP*, respectivamente, quando esses foram acrescentados nos dois tipos de dieta (convencional e com pó de folhas de tomateiro liofilizadas) porém, somente em dieta convencional essa redução foi efetiva para aumentar significativamente a mortalidade das lagartas de *T. absoluta*. A diminuição da expressão do gene *COE* sob tratamento de dsRNA *COE*, corrobora com os resultados encontrados em lagartas de *Epiphyas postvittana* de terceiro ínstar que se alimentaram com solução aquosa de 10% de sacarose contendo 1 µg de dsRNA *EposCXE1*, objetivando silenciar o gene alvo *carboxylesterase 1* (*EposCXE1*). Sete dias após a ingestão da solução, foi verificada redução significativa dos transcritos de *EposCXE*, porém o efeito do silenciamento desse gene na mortalidade das lagartas não foi descrito (Turner et al., 2006).

O gene *COE* está ligado à detoxificação de alguns grupos de inseticidas, tais como organofosforados (Vaughan e Hemingway, 1995; Karunaratne et al., 1999; Bizzaro et al., 2005), carbamatos e piretróides (Bizzaro et al., 2005). O silenciamento desse gene está relacionado à diminuição da tolerância de insetos a inseticidas (Zhang et al., 2013; Gong et al., 2014; Xu et al., 2014). Em *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphidae) foi verificado que a alimentação de dieta artificial contendo dsRNA *carboxylesterase* (*CarE*) reduziu a expressão de *CarE*, aumentando a mortalidade de pulgões pela aplicação do inseticida organofosforado omethoate (Gong et al., 2014). Pulgões da espécie *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) que se alimentaram de plantas de trigo geneticamente modificadas para expressarem dsRNA do gene *carboxylesterase* (*CbEE4*) apresentaram redução na expressão do gene *CbEE4* quando comparados àqueles que se alimentaram de plantas não transformadas. Verificou-se também diminuição significativa da enzima *CbEE4* quando os pulgões foram alimentados com plantas expressando dsRNA *CbEE4* e pulverizadas com o inseticida organofosforado phoxim em relação a quando foram alimentados em plantas não transformadas e pulverizadas com phoxim, demonstrando a relação da carboxilesterase na detoxificação de inseticidas (Xu et al., 2014).

Em *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) foi verificada redução dos transcritos dos genes *carboxylesterases* *LmCesA1* (87% após 24h e 86% após 48h de injeção de dsRNA) e de *LmCesA2* (97% após 24h de injeção de dsRNA) quando injetados com dsRNA desses dois genes. Para investigar possíveis relações de *LmCesA1* e *LmCesA2* na desintoxicação de

três inseticidas (carbaryl, clorpirifós e deltametrina), avaliou-se a susceptibilidade dos gafanhotos injetados com dsRNA *LmCesA1* e *LmCesA2* a cada um desses inseticidas. Foi verificado um aumento da susceptibilidade das ninfas ao clorpirifós quando *LmCesA1* e *LmCesA2* foram silenciados. Em contraste, a suscetibilidade das ninfas à deltametrina diminuiu após *LmCesA1* e *LmCesA2* serem silenciados. No entanto, a suscetibilidade dos insetos ao carbaryl não foi alterada quando *LmCesA1* ou *LmCesA2* foram silenciados (Zhang et al., 2013). Como populações resistentes de *T. absoluta* têm sido reportadas a diferentes moléculas inseticidas (Siqueira et al., 2000; Siqueira et al., 2001; Campos et al., 2014; Silva et al., 2011; Haddi et al., 2012; Gontijo et al., 2012; Silva et al., 2016), testes com dsRNA *COE* poderiam ser realizados para comprovação do papel desse gene na suscetibilidade dessas populações.

No caso do gene *AP*, o silenciamento desse por RNAi tem sido relacionado ao aumento da resistência a proteína *Cry* (Zhao, et al., 2016, Yuan et al., 2017). Lagartas de *H. armigera* que ingeriram dieta artificial contendo siRNA do gene *alkaline phosphatase (ALP4)* reduziram a expressão desse gene e consequentemente diminuíram a susceptibilidade a proteína *Cry2Aa* (Zhao et al., 2016). Em lagartas de *Spodoptera exigua* foi observada diminuição da expressão do gene *alkaline phosphatase (ALP2)* e menor taxa de mortalidade quando estas foram alimentadas de dieta artificial contendo siRNA *ALP2* e tratadas com a proteína *Cry2Aa* (Yuan et al., 2017). A relação entre silenciamento do gene *AP* e aumento da resistência a proteína *Cry* indica obstáculos para a utilização desse gene como promissor na estratégia de RNAi, pois algumas plantas transgênicas para controle de insetos-pragas são piramidadas para expressarem o gene *Cry* e dsRNA do gene alvo de silenciamento.

A maior mortalidade larval foi verificada no tratamento dsRNA *arginine kinase (AK)*. Também se observou que o silenciamento do gene *AK* em lagartas de *T. absoluta* aos 3 e 6 dias de alimentação em dsRNA *AK* foi suficiente para causar alta mortalidade. Essa alta mortalidade pode ser atribuída ao papel fundamental da enzima arginina quinase no metabolismo energético celular, atuando como catalisador da síntese da fosfoarginina (usada como acumulador de energia pela célula) (Bragg et al., 2012). Em *Phyllotreta striolata* (Coleoptera: Chrysomelidae) observou-se que o silenciamento do gene *AK* afetou o desenvolvimento larval, aumentando a mortalidade (Zhao et al., 2008). A eficiência do silenciamento na alta taxa de mortalidade de *T. absoluta* indica que a metodologia utilizada no presente trabalho é eficiente para *screening* de genes alvos em *T. absoluta*. Isto porque o efeito no aumento da mortalidade de lagartas de *T. absoluta* foi encontrado quando lagartas se

alimentaram de plantas transformadas expressando dsRNA do gene *AK* (Camargo, 2014; Camargo et al., 2016; Bento et al., 2016).

Em relação ao parâmetro avaliado “peso de pupa”, esse não foi influenciado pelos tratamentos utilizados, não sendo um indicador adequado para seleção de genes alvos de silenciamento por RNAi em lagartas de *T. absoluta*. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos, mesmo naqueles que apresentaram alta taxa de mortalidade e significativa redução do acúmulo de transcritos dos genes alvos. Isto pode estar relacionado ao fato de que as lagartas que atingiram a fase de pupa, de alguma forma, não apresentaram o desenvolvimento afetado pelo tratamento de dsRNA, havendo uma seleção dos indivíduos não prejudicados. Além disso, ao analisar os pesos de pupa obtidos nos controles onde as lagartas se alimentaram de dieta artificial, nota-se menores valores comparados àqueles normalmente encontrados em pupas provenientes de lagartas que se alimentaram em dieta natural (plantas de tomateiro). O parâmetro de duração larval foi reduzido somente para dois genes relacionados à síntese de hormônios juvenil (*JHEH*) e ecdisônio (*PHM*), e para os genes *COE* e *AP*. A duração do período larval é aumentada em 9 dias quando lagartas de *T. absoluta* são alimentadas com dieta artificial, comparada com dieta natural (plantas de tomateiro) (Bajonero e Parra, 2017). Isso pode indicar que esse também não é um parâmetro eficiente para avaliação do efeito do silenciamento gênico por RNAi utilizando a dieta artificial de Bajonero e Parra (2017). Já o parâmetro “mortalidade” apresentou-se como o melhor parâmetro biológico para avaliar os efeitos do dsRNA utilizando dieta artificial de *T. absoluta*, visto que os resultados dos controles “dieta” e “HT115 não transformada” não sofreram variações significativas em todos os experimentos realizados e não apresentaram mortalidade inferior a 75%.

Os tratamentos controles “dieta” e “HT115 não transformada” apresentaram diferenças muito pequenas, de 1,5%, no percentual médio de mortalidade, sendo 23,7% e 25,2%, respectivamente. Isso demonstrou que a bactéria *E. coli* HT115 quando ingerida não é capaz de induzir resposta imune em lagartas de *T. absoluta*, como relatado para *Bombix mori* e *Rhodnius prolixus* (Wu et al., 2010; Vieira et al., 2014). Por outro lado, para o controle com dsRNA *GFP* foi observado um percentual médio de mortalidade de 28,9% e 42,2%, quando adicionado a dieta convencional e dieta acrescida de pó de folhas de tomateiro liofilizadas, demonstrando possível efeito desse tratamento na maquinaria de RNAi. Nas análises de expressão gênica foi verificada alteração na expressão relativa de alguns genes alvos quando utilizado dsRNA *GFP* como controle negativo, em alguns períodos de alimentação de *T. absoluta*. Essa alteração também foi observada em abelhas (*Apis mellífera*) quando dsRNA

GFP foi utilizado como controle negativo (Nunes et al., 2013). Embora o gene *GFP* seja amplamente utilizado como controle negativo em ensaios de RNAi, existe a possibilidade que esse exerça um efeito sobre a expressão de certos genes do inseto. Alterações da expressão em genes não alvos foram detectadas em lagartas de *Diatraea saccharalis* alimentadas com solução de sacarose contendo dsRNA *GFP* (Bardella, 2015). Apesar de não ter sido observado efeito de dsRNA *GFP* na mortalidade de *T. absoluta*, em ninfas de *D. citri* foi observado que concentrações do tratamento controle de dsRNA *GFP* de 500 e 1000 ng μL^{-1} causaram aumento significativo da mortalidade em comparação com o controle de 15% sacarose após 120 h de alimentação. Esse efeito indica que altas concentrações de dsRNAs sejam capazes de iniciar efeitos de saturação da via de RNAi fora de destino, sendo deletérios para ninfas de *D. citri* (Galdeano et al., 2017).

Lagartas de *T. absoluta* que se alimentaram de dieta artificial contendo *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA dos genes *arginine kinase* (*AK*), *alkaline phosphatase* (*AP*), *carboxylesterase* (*COE*), *chitin synthase A* (*CHI*) e *juvenile hormone inducible protein* (*JHP*) apresentaram maior mortalidade na fase larval.

CHI e *JHP* podem ser considerados como promissores alvos de silenciamento por RNAi. Esses genes, apesar de apresentarem valor de mortalidade intermediário (45,6%), tratam-se de genes específicos a artrópodes. Além disso, na análise de especificidade do gene *CHI* não foi identificada identidade com nenhuma sequência maior ou igual a 21 nt de outros organismos. Para o gene *JHP* foi encontrada somente uma espécie de inseto com identidade 100%, sendo que esse não faz parte da teia ecológica de *T. absoluta*. No caso do gene *CHI*, o silenciamento ocorreu somente aos 3 dias e já foi suficiente para causar uma mortalidade significativa em lagartas de *T. absoluta*. Futuros testes poderiam ser realizados com o objetivo de avaliar os efeitos do silenciamento desses dois genes combinados. Como, por exemplo, transformação piramidada de plantas para expressão de dsRNA *CHI* e *JHP* ou por meio da utilização de bactérias expressando dsRNA desses dois genes em conjunto (ao mesmo tempo ou em mistura de solução bacteriana). Lagartas de *H. armigera* alimentadas com plantas de algodão expressando proteínas Cry e dsRNA dos genes *juvenile hormone acid methyltransferase* e *juvenile hormone binding protein* apresentaram maior mortalidade quando comparadas com aquelas que se alimentaram em plantas que possuíam somente um evento transgênico (Ni et al., 2017). Trabalhos futuros poderiam avaliar outros genes da categoria da síntese do hormônio juvenil e síntese de quitina, visto os bons resultados alcançados com o gene *JHP* e *CHI*.

3.5. Conclusões

A metodologia por meio de alimentação de lagartas em dieta artificial contendo bactérias *Escherichia coli* HT115 (DE3), expressando dsRNA genes de *Tuta absoluta* é eficiente para avaliar silenciamento gênico por RNAi, permitindo *screening* de grande quantidade de genes e permitindo avaliar os efeitos do silenciamento no desenvolvimento de *T. absoluta*.

Os genes *arginine kinase*, *chitin synthase A* e *juvenile hormone inducible protein* são promissores para uso de silenciamento por RNAi como estratégia de controle de lagartas de *T. absoluta*.

Referências

- Andersen, C.L.; Jensen, J.L.; Orntoft, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, p. 5245-5250, 2004.
- Arnó, J.; Gabarra, R. Side effects of selected insecticides on the *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) predators *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae). **Journal of Pest Science**, v. 84, p. 513-520, 2011.
- Asokan, R.; Sharath Chandra, G.; Manamohan, M.; Krishna Kumar, N.K.; Sita, T. Response of various target genes to diet-delivered dsRNA mediated RNA interference in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Journal of Pest Science**, v. 87, p. 163-172, 2014.
- Bachman, P.M.; Bolognesi, R.; Moar, W.J.; Mueller, G.M.; Paradise, M.S.; Ramaseshadri, P.; Tan, J.; Uffman, J.P.; Warren, J.; Wiggins, B.E.; Levine, S.L. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). **Transgenic Research**, v. 22, p. 1207–1222, 2013.
- Bajonero, J.G; Parra, J.R.P. Selection and suitability of an artificial diet for *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) based on physical and chemical characteristics. **Journal of Insect Science**, v. 17, p. 1-8, 2016.
- Bardella, D.Z. **Silenciamento gênico via RNAi visando o controle da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*)**. 2017. 80 p. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.
- Baum, J.A.; Bogaert, T.; Clinton, W.; Heck, G.R.; Feldmann, P.; Ilagan, O.; Johnson, S.; Plaetinck, G.; Munyikwa, T.; Pleau, M.; Vaughn, T.; Roberts, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1322-1326, 2007.

Bautista, M.A.M.; Miyata, T.; Miura, K.; Tanaka, T. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 38-46, 2009.

Bento, F.M.M.; Camargo, R.; Figueira, A. Effects of RNAi transgenic tomato on mortality of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). In: **International Congress of Entomology**, Orlando, FL. 2016.

Biondi, A.; Mommaerts, V.; Smagghe, G.; Viñuela, E.; Zappalà, L.; Desneux, N. The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1523-1536. 2012.

Bizzaro, D.; Mazzoni, E.; Barbolini, E.; Giannini, S.; Cassanelli, S.; Cravedi, P.; Manicardi, G.C. Relationship among expression, amplification, and methylation of FE4 esterase genes in Italian populations of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 81, p. 51-58, 2005.

Bloem, K.A., Kelley, K.C.; Duffey, S.S. 1989. Differential effects of tomatine and its alleviation by cholesterol on larval growth and efficiency of food utilization in *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, p. 387-397, 1989.

Bragg, J.; Rajkovic, A.; Anderson, C.; Curtis, R.; Van Houten, J.; Begres, B.; Naples, C.; Snider, M.; Fraga, D.; Singer, M. Identification and characterization of a putative arginine kinase homolog from *Myxococcus xanthus* required for fruiting body formation and cell differentiation. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 2668-2676, 2012.

Brody, J.R.; Kern, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **Bio Techniques**, v. 36, p. 214-216, 2004,

Camargo, R.A. **RNAi para o controle de *Tuta absoluta* em tomateiro**. 2014. 110 p. Tese (Doutorado em Ciências – Programa Internacional Biologia Celular e Molecular Vegetal) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Camargo, R.A.; Herai, R.H.; Santos, L.N., Bento, F.M.M.; Lima, J.E.; Marques-Souza, H.; Figueira, A. *De Novo* transcriptome assembly and analysis to potential gene targets for RNAi-mediated control of the tomato leafminer (*Tuta absoluta*). **BMC Genomics**, v.16. p.1-17, 2015.

Camargo, R.A.; Barbosa G.O.; Possignolo, I.P.; Peres, L.E.P.; Lam, E.; Lima, J.E.; Figueira, A.V.O.; Marques-Souza, H. RNA interference as a gene silencing tool to control *Tuta absoluta* in tomato (*Solanum lycopersicum*) **PeerJ Preprints**, v. 4, e2406v1, 2016.

Campos, M.R.; Rodrigues, A.R.S.; Silva, W.M.; Silva, T.B.M.; Silva, V.R.F.; Guedes, R.N.C.; Siqueira, H.A.A. Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: a bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. **Plos One**, v. 9, e103235, 2014.

Cifuentes, D.; Chynoweth, R.; Bielza, P. Genetic study of mediterranean and south american populations of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Povolny, 1994) (Lepidoptera: Gelechiidae) using ribosomal and mitochondrial markers. **Pest Management Science**, v. 67, p. 1155-1162, 2011.

Chandra, G.S.; Asokan, R.; Manamohan, M.; Kumar, N.K.K.; Sitac, T. Evaluation of reference genes for quantitative Real Time PCR normalization in Cotton Bollworm *Helicoverpa armigera*. **Molecular Biology**, v. 48, p. 813–822, 2014.

Conesa, A.; Götz, S.; Garcia-Gomez, J.M.; Terol, J.; Talon, M.; Robles, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, p. 3674-3676, 2005.

Demétrio, C.G.B.; Hinde, J.; Moral, R.A. Models for overdispersed data in entomology. In: Ferreira, C.P.; Godoy, W.A.C. (Eds). **Ecological modelling applied to entomology**. New York: Springer, 2014. p.219-259.

Desneux, N.; Decourtye, A.; Delpuech, J.M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 81-106, 2007.

Desneux, N.; Luna, M.G.; Guillemaud, T.; Urbaneja, A. The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. **Journal of Pest Science**, v. 84, p. 403-408, 2011.

Dinan, L.; Hormann R.E. Ecdysteroid agonists and antagonists. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K.; Gill, S. (Eds.). **Comprehensive Molecular Insect Science**, Elsevier, 2005. v. 3, p. 197-242.

Evangelista, C.C.S.; Borges, G.; Pereira, T.C. **Desenho racional de dsRNA**. In: Introdução à técnica de Interferência por RNA-RNAi. Pereira, T.C. (Coord.). Sociedade Brasileira de Genética: Ribeirão Preto, Ed. Cubo, 2013. 170p.

Fishilevich, E.; Vélez, A.M.; Storer, N.P.; Li, H.; Bowling, A.J.; Rangasamy, M.; Worden, S.E.; Narva, K.E.; Siegfried, B.D. RNAi as a management tool for the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. **Pest Management Science**, v. 72, p. 1652–1663, 2016.

Galdeano, D.M.; Breton, M.C.; Lopes, J.R.S.; Falk, B.W.; Machado, M.A. Oral delivery of double-stranded RNAs induces mortality in nymphs and adults of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Plos One**, v. 12, e0171847, 2017.

Ganbaatar, O.; Cao, B.; Zhang, Y.; Bao, D.; Bao, W.; Wuriyangan, H. Knockdown of *Mythimna separata* chitinase genes via bacterial expression and oral delivery of RNAi effectors. **BMC Biotechnology**, v.17, p.1-11, 2017.

Gong, Y.H.; Yu, X.R.; Shang, Q.L.; Shi, X.Y.; Gao, X.W. Oral delivery mediated RNA interference of a carboxylesterase gene results in reduced resistance to organophosphorus insecticides in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. **Plos One**, v. 9, e102823, 2014.

Gontijo, P.C.; Picanço, M.C.; Pereira, E.J.G.; Martins, J.C.; Chediak, M.; Guedes, R.N.C. Spatial and temporal variation in the control failure likelihood of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*. **Annals of Applied Biology**, v. 162, p. 50-59, 2012.

Gordon, K. H.J.; Waterhouse, P.M. RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1231-1232, 2007.

Guedes, R.N.C.; Picanço, M.C. The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. **EPPO Bulletin**, v. 42, p. 211–216, 2012.

Haddi, K.; Berger, M.; Bielza, P.; Cifuentes, D.; Field, L.M.; Gorman, K.; Rapisarda C.; Williamson, M.S.; Bass, C. Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the voltage-gated sodium channel of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, p. 506-513, 2012.

Heckel, D.G. Insect detoxification and sequestration strategies. **Annual Plant Reviews**, v. 47, p. 77–114, 2014.

Huvenne, H.; Smagghe, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 227-235, 2010.

Jin, S.; Singh, N.D.; Li, L.; Zhang, X.; Daniell, H. Engineered chloroplast dsRNA silences cytochrome p450 monooxygenase, V-ATPase and chitin synthase genes in the insect gut and disrupts *Helicoverpa armigera* larval development and pupation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, p. 435–446, 2015.

Joga, M.R.; Zotti, M.J.; Smagghe, G.; Christiaens, O. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. 553, 14p, 2016.

Karunaratne, S.H.P.P.; Small, G.J.; Hemingway, J. Characterization of the elevated esterase-associated insecticide resistance mechanism in *Nilaparvata lugens* (Stal) and other planthopper species. **International Journal of Pest Management**, v. 45, p. 225-230, 1999.

Khajuria, C.; Buschman, L.L.; Chen, M.S.; Muthukrishnan, S.; Zhu, K.Y. A gut specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 621-629, 2010.

Kontogiannatos, D.; Swevers, L.; Kourti, A. Recent gene multiplication and evolution of a juvenile hormone esterase-related gene in a lepidopteran pest. **Gene Reports**, v. 4, p. 139–152, 2016.

Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; Mcgettigan, P.A.; Mcwilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Higgins, D.G. Clustal W and clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

Li, X.; Zhang, M.; Zhang, H. RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. **Plos One**, v. 6: e17788, 2011.

Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

Luan, J.B.; Ghanim, M.; Liu, S.S.; Czosnek, H. Silencing the ecdysone synthesis and signaling pathway genes disrupts nymphal development in the whitefly. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, p. 740-746, 2013.

Mao, Y.B.; Cai, W.J.; Wang, J.W.; Hong, G.J.; Tao, X.Y.; Wang, L.J.; Huang, Y.P.; Chen, X.Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1307-1313, 2007.

Marchal, E.; Badisco, L.; Verlinden, H.; Vandersmissen, T.; Van Soest, S.; Van Wielendaele, P.; Broeck, J.F. Role of the Halloween genes, Spook and Phantom in ecdysteroidogenesis in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 1240-1248, 2011.

Michereff Filho, M.; Guimarães, J.A.; Moura, A.P. **A traça do tomateiro no mundo**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2013. 31 p.

Minakuchi, C.; Namiki, T.; Shinoda, T. Krüppel homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Developmental Biology**, v. 325, p. 341-350, 2009.

Ni, M.; Ma, W.; Wang, X.; Gao, M.; Dai, Y.; Wei, X.; Zhang, L.; Peng, Y.; Chen, S.; Ding, L.; Tian, Y.; Li, J.; Wang, H.; Wang, X.; Xu, G.; Guo, W.; Yang, Y.; Wu, Y.; Heuberger, S.; Tabashnik, B.E.; Zhang, T.; Zhu, Z. Next-generation transgenic cotton: pyramiding RNAi and Bt counters insect resistance. **Plant Biotechnology Journal**, p. 1-10, 2017.

Nunes, F.M.F.; Aleixo, A.C.; Barchuk, A.R.; Bomtorin, A.D.; Grozinger, C.M.; Simões, Z.L.P. Non-target effects of Green Fluorescent Protein (GFP)-derived double-stranded RNA (dsRNA-GFP) used in honey bee RNA Interference (RNAi) assays. **Insects**, v. 4, p. 90-103, 2013.

Osier, T.L.; Traugott, M.S.; Stamp, N.E. Allelochemicals in tomato leaves affect a specialist insect herbivore *Manduca sexta* negatively but with no ill effects on a generalist insect predator, *Podisus maculiventris*. **Oikos**, v. 77, p. 481-488, 1996.

Pereira, T.C. **Introdução à técnica de Interferência por RNA - RNAi**. PEREIRA, T.C. (Coord). Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2013. 170p.

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

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>. 2017.

Ridgeway, J.A.; Timm, A.E. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in larvae of three species of Grapholitini (Lepidoptera: Tortricidae). **Plos One**, v. 6, e0129026, 2015.

Rodrigues, T.B.; Figueira, A. Management of insect pest by RNAi: a new tool for crop protection. In: **RNA Interference**. 1ed.: InTech, 2016.

Rozen, S.; Skaletsky, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S.; Misener, S. (Eds) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, NJ, 2000. p 365-386.

Singh, P. A general purpose laboratory diet mixture for rearing insects. **Insect Science and its Application**, v. 4, p. 357–362, 1983.

Shi, J.; Mu, L.; Chen, X.; Guo, W.; Li, G. RNA interference of chitin synthase genes inhibits chitin biosynthesis and affects larval performance in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **International Journal of Biological Sciences**, v. 12, p. 1319-1331, 2016.

Shukla, J.N.; Kalsi, M.; Sethi, A.; Narva, K.E.; Fishilevich, E.; Singh, S.; Mogilicherla, K.; Palli, S.R. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. **RNA Biology**, v.13, p.656-669, 2016.

Silva, G.A.; Picanço, M.C.; Bacci, L.; Crespo, A.L.B.; Rosado, J.F.; Guedes, R.N.C. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science**, v. 67, p. 913-920, 2011.

Siqueira, H.A.A.; Guedes, R.N.C.; Picanço, M.C. Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Agricultural and Forest Entomology**, v. 2, p. 147–153, 2000.

Siqueira, H.A.A.; Guedes, R.N.C.; Fragoso, D.B.; Magalhães, L.C. Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **International Journal of Pest Management**, v. 47, p. 247-251, 2001.

Terenius, O.; Papanicolaou, A.; Garbutt, J.S.; Eleftherianos, I.; Huvenne, H.; Kanginakudru, S.; Albrechtsen, M.; An, C.; Aymeric, J.L.; Barthel, A.; Bebas, P.; Bitra, K.; Bravo, A.; Chevalier, F.; Collinge, D.P.; Crava, C.M.; Maagd, R.A.; Duvic, B.; Erlandson, M.; Faye, I.; Felföldi, G.; Fujiwara, H.; Futahashi, R.; Gandhe, A.S.; Gatehouse, H.S.; Gatehouse, L.N.; Giebultowicz, J.M.; Gómez, I.; Grimmelikhuijzen, C.J.P.; Groot, A.T.; Hauser, F.; Heckel, D.G.; Hegedus, D.D.; Hrycaj, S.; Huang, L.; Hull, J.J.; Iatrou, K.; Iga, M.; Kanost, M.R.; Kotwica, J.; Li, C.; Li, J.; Liu, J.; Lundmark, M.; Matsumoto, S.; Meyering-Vos, M.; Millichap, P.J.; Monteiro, A.; Mrinal, N.; Niimi, T.; Nowara, D.; Ohnishi, A.; Oostra, V.; Ozaki, K.; Papakonstantinou, M.; Popadic, A.; Rajam, M.V.; Saenko, S.; Simpson, R.M.; Soberón, M.; Strand, M.R.; Tomita, S.; Toprak, U.; Wang, P.; Wee, C.W.; Whyard, S.; Zhang, W.; Nagaraju, J.; Ffrench-Constant, R.H.; Herrero, S.; Gordon, K.; Swevers, L.; Smagghe, G. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 231-245, 2011.

Tian, H.; Peng, H.; Yao, Q.; Chen, H.; Xie, Q.; Tang, B.; Zhang, W. Developmental control of a Lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacterial expressing dsRNA of a non-midgut gene. **Plos One**, v. 4, e6225, 2009.

Timmons, L.; Court, D.L.; Fire, A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**, v. 263, p. 103-112, 2001.

Traugott, M.S.; Stamp, N.E. Effects of chlorogenic acid and tomatine-fed caterpillars on performance of an insect predator. **Oecologia**, v. 109, p. 265-272, 1996.

Turner, C.T.; Davy, M.W.; Macdiarmid, R.M.; Plummer, K.M.; Birch, N.P. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. **Insect Molecular Biology**, v. 15, p. 383-391, 2006.

Upadhyay, S.K.; Chandrashekar, K.; Thakur, N.; Verma, P.C.; Borgio, J.F.; Singh, P.K.; Tuli, T. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. **Journal of Biosciences**, v. 36, p. 153-161, 2011.

Urbaneja, A.; Gonzalez-Cabrera, J.; Arno, J.; Gabarra, R. Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1215–1222, 2012.

Urbaneja, A.; Desneux, N.; Gabarra, J. A.; Gonzalez-Cabrera, L.; Mafra-Neto, J.; Stoltman, A.; Pinto, A.; Parra, J.R.P. **Biology, ecology and management of the South American Tomato pinworm, *Tuta absoluta***, p. 98–125. In J. Peña (ed.), Potential invasive pest of agricultural crops. CABI, Boston. 2013.

Vaughan, A.; Hemingway, J. Mosquito carboxylesterase Est alpha 2(1) (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 14, p. 17044-17049, 1995.

Vieira, C.; Waniek, P.; Mattos, D.; Castro, D.; Mello, C.; Ratcliffe, N.; Garcia, E.S.; Azambuja, P. Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides in the midgut. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 232, 2014.

Wang, J.; Gu, L.; Ireland, S.; Garczynski, S.F.; Knipple, D.C. Phenotypic screen for RNAi effects in the codling moth *Cydia pomonella*. **Gene**, v. 572, p. 184-90, 2015.

Wu, S.; Zhang, X.; He, Y.; Shuai, J.; Chen, X.; Ling, E. Expression of antimicrobial peptide genes in *Bombyx mori* gut modulated by oral bacterial infection and development. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, p. 1191–1198, 2010.

Xu, L.; Duan, X.; Lv, Y.; Zhang, X.; Nie, Z.; Xie, C.; Ni, Z.; Liang, R. Silencing of an aphid carboxylesterase gene by use of plant-mediated RNAi impairs *Sitobion avenae* tolerance of Phoxim insecticides. **Transgenic Research**, v. 23, p. 389–396, 2014.

Xue, X.Y.; Mao, Y.B.; Tao, X.Y.; Huang, Y.P.; Chen, X.Y. New approaches to agricultural insect pest control based on RNA interference. **Advances in Insect Physiology**, v. 42, p. 73-117, 2012.

Yang, J.; Han, Z. Efficiency of different methods for dsRNA delivery in Cotton Bollworm (*Helicoverpa armigera*). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, p. 115-123, 2014.

Yang, J.; Zhao, H. Efficiency of different methods for dsRNA delivery in Cotton Bollworm (*Helicoverpa armigera*). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, p. 115-123, 2014.

Yang, Y.L.; Zhu, Y.C.; Ottea, J.; Husseneder, C.; Leonard, B.R.; Abel, C.; Huang, F. Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis* susceptible and -resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 592-603, 2010.

Yu, N.; Christiaens, O.; Liu, J.; Niu, J.; Cappelle, K.; Caccia, S.; Huvenne, H.; Smagghe, G. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. **Insect Science**, v. 20, p. 4–14, 2013.

Yuan, X.; Zhao, M.; Wei, J.; Zhang, W.; Wang, B.; Khaing, M.M.; Liang, G. New insights on the role of alkaline phosphatase 2 from *Spodoptera exigua* (Hübner) in the action mechanism of Bt toxin Cry2Aa. **Journal of Insect Physiology**, v. 98, p. 101–107, 2017.

Zhang, H.; Li, H.C.; Miao, X.X. Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. **Insect Science**, v. 20, p. 15 – 30, 2012.

Zhang, X.; Liu, X.; Ma, J.; Zhao, J. Silencing of cytochrome P450 CYP6B6 gene of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) by RNAi. **Bulletin of Entomological Research**, v. 103, p. 584–591, 2013.

Zhang, J.; Khan, S.A.; Heckel, D.G.; Bock, R. Next-Generation Insect-Resistant Plants: RNAi-Mediated Crop Protection. **Trends in Biotechnology**, v. 35, p. 871-882, 2017.

Zhao, Y.; Yang, G.; Wang-Pruski, G.; You, M. *Phyllotreta striolata* (Coleoptera: Chrysomelidae): Arginine kinase cloning and RNAi-based pest control. **European Journal of Entomology**, v. 105, p. 815-822, 2008.

Zhao, M.; Yuan, X.; Wei, J.; Zhang, W.; Wang, B.; Khaing, M.M.; Liang, G. Functional roles of cadherin, aminopeptidase-N and alkaline phosphatase from *Helicoverpa armigera* (Hübner) in the action mechanism of *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa. **Scientific Reports**, v. 7, n. 46555, 2016.

Zhou, W.; Liang, Q.; Xu, Y.; Gurr, G.M.; Bao, Y.; Zhou, X.; Zhang, C.; Cheng, J.; Zhu, Z. Genomic insights into the glutathione s-transferase gene family of two rice planthoppers, *Nilaparvata lugens* (Stål) and *Sogatella furcifera* (Horváth) (Hemiptera: Delphacidae). **Plos One**, v. 8, e56604, 2013.

Zotti, M.J.; Smagghe, G. RNAi technology for insect management and protection of beneficial insects from diseases: lessons, challenges and risk assessments. **Neotropical Entomology**, v. 44, p. 197–213, 2015.

Zou, X.; Xu, Z.; Zou, H.; Liu, J.; Chen, S.; Feng, Q.; Zheng, S. Glutathione S-transferase SIGSTE1 in *Spodoptera litura* may be associated with feeding adaptation of host plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 70, p. 32-43, 2016.

ANEXO

juvenil hormone inducible protein (JHP)

Drosophila ananassae uncharacterized protein (Dana\GF11007), partial mRNA

Sequence ID: [XM_001958561.2](#) Length: 663 Number of Matches: 1

Range 1: 15 to 35 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
39.2 bits(42)	1.3	21/21(100%)	0/21(0%)	Plus/Minus
Query 132	AGAACGAAGGCCCAACAAGG	152		
Sbjct 35	AGAACGAAGGCCCAACAAGG	15		

juvenile hormone epoxide hydrolase protein (JHEH)

PREDICTED: *Theobroma cacao* ornithine aminotransferase, mitochondrial (LOC18596474), mRNA

Sequence ID: [XM_018123814.1](#) Length: 2014 Number of Matches: 1

Range 1: 1840 to 1861 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
41.0 bits(44)	8.9	22/22(100%)	0/22(0%)	Plus/Plus
Query 403	GCATCCCTGGATATGGATTCTC	424		
Sbjct 1840	GCATCCCTGGATATGGATTCTC	1861		

ecdysteroid 25-hydroxylase (PHM)

PREDICTED: *Drosophila miranda* protein HEXIM1 (LOC108157325), mRNA

Sequence ID: [XM_017289342.1](#) Length: 1447 Number of Matches: 1

Range 1: 906 to 926 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
39.2 bits(42)	4.4	21/21(100%)	0/21(0%)	Plus/Plus
Query 440	CCATGAGATGGGCGTAGCAGG	460		
Sbjct 906	CCATGAGATGGGCGTAGCAGG	926		

Drosophila pseudoobscura pseudoobscura uncharacterized protein (Dpse\GA17490), mRNA

Sequence ID: [XM_001358431.4](#) Length: 1455 Number of Matches: 1

Range 1: 930 to 950 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
39.2 bits(42)	4.4	21/21(100%)	0/21(0%)	Plus/Plus
Query 440	CCATGAGATGGGCGTAGCAGG	460		
Sbjct 930	CCATGAGATGGGCGTAGCAGG	950		

Drosophila persimilis GL24417 (Dper\GL24417), mRNA

Sequence ID: [XM_002013906.1](#) Length: 1026 Number of Matches: 1

Range 1: 810 to 830 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
39.2 bits(42)	4.4	21/21(100%)	0/21(0%)	Plus/Plus
Query 440	CCATGAGATGGGCGTAGCAGG	460		
Sbjct 810	CCATGAGATGGGCGTAGCAGG	830		

glutathione s-transferase epsilon 2 (GST)

PREDICTED: *Bactrocera oleae* 27 kDa hemolymph protein-like (LOC106621561), mRNA

Sequence ID: [XM_014240485.1](#) Length: 2236 Number of Matches: 1

Range 1: 1725 to 1746 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
41.0 bits(44)	0.73	22/22(100%)	0/22(0%)	Plus/Plus

Query 187 TTCTACTTTAAACATATTTGTT 208

Sbjct 1725 TTCTACTTTAAACATATTTGTT 1746

PREDICTED: *Ricinus communis* leucine-rich repeat receptor-like protein kinase PXL2 (LOC8263244), mRNA

Sequence ID: [XM_015723698.1](#) Length: 826 Number of Matches: 1

Range 1: 531 to 552 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
41.0 bits(44)	5.9	22/22(100%)	0/22(0%)	Plus/Plus

Query 82 ACCAATTGAAGAGGCATATGGA 103

Sbjct 531 ACCAATTGAAGAGGCATATGGA 552

PREDICTED: *Ricinus communis* receptor-like protein kinase HSL1 (LOC8281370), mRNA

Sequence ID: [XM_002521731.2](#) Length: 3744 Number of Matches: 1

Range 1: 3217 to 3238 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
41.0 bits(44)	5.9	22/22(100%)	0/22(0%)	Plus/Plus

Query 82 ACCAATTGAAGAGGCATATGGA 103

Sbjct 3217 ACCAATTGAAGAGGCATATGGA 3238

PREDICTED: *Haplochromis burtoni* armadillo repeat containing 8 (armc8), transcript variant X1, mRNA

Sequence ID: [XM_005933362.2](#) Length: 4875 Number of Matches: 1

Range 1: 2914 to 2935 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
41.0 bits(44)	5.9	22/22(100%)	0/22(0%)	Plus/Plus

Query 216 ATGAGAAATATGTAAAAATACA 237

Sbjct 2914 ATGAGAAATATGTAAAAATACA 2935

PREDICTED: *Pundamilia nyererei* armadillo repeat containing 8 (armc8), transcript variant X1, mRNA

Sequence ID: [XM_005746298.1](#) Length: 2803 Number of Matches: 1

Range 1: 2697 to 2718 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
41.0 bits(44)	5.9	22/22(100%)	0/22(0%)	Plus/Plus

Query 216 ATGAGAAATATGTAAAAATACA 237

Sbjct 2697 ATGAGAAATATGTAAAAATACA 2718

carboxylesterase (COE)

PREDICTED: *Stomoxys calcitrans* fasciclin-1 (LOC106083762), transcript variant X1, mRNA

Sequence ID: [XM_013247001.1](#) Length: 3225 Number of Matches: 1

Range 1: 2925 to 2945 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
39.2 bits(42)	4.0	21/21(100%)	0/21(0%)	Plus/Minus

Query 261 TATATCATTTCGCAATTTGTGT 281
Sbjct 2945 TATATCATTTCGCAATTTGTGT 2925

PREDICTED: *Stomoxys calcitrans* scavenger receptor class B member 1 (LOC106082157), transcript variant X1, mRNA

Sequence ID: [XM_013244545.1](#) Length: 3337 Number of Matches: 1

Range 1: 414 to 434 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
39.2 bits(42)	4.0	21/21(100%)	0/21(0%)	Plus/Minus

Query 303 TGAAAGATTTTATCAAAGCA 323
Sbjct 434 TGAAAGATTTTATCAAAGCA 414

PREDICTED: *Dasytus novemcinctus* transmembrane protein 196 (TMEM196), transcript variant X2, mRNA

Sequence ID: [XM_012527358.1](#) Length: 3163 Number of Matches: 1

Range 1: 894 to 915 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
41.0 bits(44)	9.3	22/22(100%)	0/22(0%)	Plus/Plus

Query 70 TTCAAGAATGCCATAATTCAA 91
Sbjct 894 TTCAAGAATGCCATAATTCAA 915

PREDICTED: *Carlito syrichta* transmembrane protein 196 (TMEM196), mRNA

Sequence ID: [XM_008071163.1](#) Length: 2002 Number of Matches: 1

Range 1: 928 to 949 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
41.0 bits(44)	9.3	22/22(100%)	0/22(0%)	Plus/Plus

Query 70 TTCAAGAATGCCATAATTCAA 91
Sbjct 928 TTCAAGAATGCCATAATTCAA 949

alkaline phosphatase (AP)

PREDICTED: Amyelois transitella putative tRNA pseudouridine synthase Pus10 (LOC106138902), mRNA
 Sequence ID: [XM_013340195.1](#) Length: 1709 Number of Matches: 1

Range 1: 802 to 822 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
39.2 bits(42)	4.2	21/21(100%)	0/21(0%)	Plus/Plus

Query 190 GCGCGCCGCCGCTGCTGCC 210
 Sbjct 802 GCGCGCCGCCGCTGCTGCC 822

PREDICTED: Drosophila obscura 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase-like (LOC111069793), mRNA
 Sequence ID: [XM_022359985.1](#) Length: 1500 Number of Matches: 1

Range 1: 1276 to 1297 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
41.0 bits(44)	1.2	22/22(100%)	0/22(0%)	Plus/Plus

Query 227 CTGCTGGTGACGGCTGACACG 248
 Sbjct 1276 CTGCTGGTGACGGCTGACACG 1297

Chlorella variabilis hypothetical protein (CHLNCDRAFT_142350) mRNA, complete cds
 Sequence ID: [XM_005850362.1](#) Length: 2034 Number of Matches: 1

Range 1: 1470 to 1491 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
41.0 bits(44)	9.7	22/22(100%)	0/22(0%)	Plus/Minus

Query 193 CGCCGCCGCGCTGCTGCCCGAG 214
 Sbjct 1491 CGCCGCCGCGCTGCTGCCCGAG 1470

4. ESTUDO DO USO DE BACTÉRIA ENDOFÍTICA COMO MEIO DE ENTREGA DE DUPLA FITA DE RNA (dsRNA) PARA *Tuta absoluta*

RESUMO

Microorganismos endofíticos habitam o interior de plantas hospedeiras sem causar danos aparentes ou estrutura externa visível. Além da ocorrência natural de endofíticos, é possível desenvolver estratégias de controle de organismos nocivos a partir de bactérias endofíticas geneticamente modificadas. A técnica de silenciamento gênico por meio de RNA de interferência (RNAi) vem sendo apontada como nova estratégia no controle de insetos-pragas agrícolas. Por meio da ingestão de fita dupla de RNA (dsRNA), via alimentação, pode-se obter efeitos de silenciamento de diversos genes alvos, como mortalidade e prejuízo ao desenvolvimento dos insetos. Um método de entrega que pode ser utilizado eficientemente, principalmente para insetos que apresentam recalcitrância a técnica de RNAi, é o oferecimento, via alimentação, de bactérias expressando dsRNA. Com o objetivo de aplicar bactérias que se desenvolvam no mesmo hábitat de insetos-pragas para o controle das mesmas, estudou-se a colonização de bactérias endofíticas em plantas de tomateiro cultivar “Micro-Tom” para posterior transformação e utilização como estratégia de entrega de dsRNA para silenciamento de genes alvo de *Tuta absoluta*, uma das principais pragas do tomateiro no mundo. Estudou-se a colonização de três bactérias endofíticas, *Pantoea agglomerans* linhagem 33.1, *Burkholderia* sp. linhagem SCMS54 e *Burkholderia ambifaria* linhagem RZ2MS16, em plantas de tomateiro e em lagartas de *T. absoluta*. *P. agglomerans* apresentou os melhores resultados de colonização de plantas de tomateiro “Micro-Tom” e lagartas de *T. absoluta*. Imagens de microscopia de fluorescência demonstraram que essa bactéria coloniza células do parênquima das folhas, tecido preferencialmente utilizados na alimentação das lagartas de *T. absoluta*. Células eletrocompetentes de *P. agglomerans* foram transformadas com o plasmídeo L4440:genes alvos de *T. absoluta* (*glutathione S-transferase epsilon 2*; *chitin synthase A*; *juvenile Hormone inducible protein*), porém não foram induzíveis a produzir dsRNA desses genes. As lagartas não apresentaram diferenças na mortalidade larval ao se alimentarem de plantas de tomateiro “Micro-Tom” inoculadas com essas bactérias. Trabalhos futuros podem explorar essa espécie de bactéria para produção de dsRNA.

Palavras-chave: Microorganismo; *Pantoea agglomerans*; Colonização; Traça-do-tomateiro

ABSTRACT

Endophytic microorganisms inhabit the interior of host plants without causing apparent damage or visible external structure. In addition to the natural occurrence of endophytic, it is possible to develop strategies to control harmful organisms from genetically modified endophytic bacteria. The technique of gene silencing by RNA interference (RNAi) is a new strategy to control agricultural insect pests. By ingestion of double-stranded RNA (dsRNA) via feeding, it is possible to obtain silencing effects of several target genes on insects, such as mortality and damage to insect development. A method of delivery that can be efficiently used, especially for insects that present recalcitrance to the RNAi technique, is the feeding of bacteria expressing dsRNA. With the objective of applying bacteria growing in the same insect-pest habitat for their control, we studied the colonization of endophytic bacteria in “Micro-Tom” tomato plants for further transformation and use as a strategy to deliver dsRNA for silencing *Tuta absoluta* target genes, one of the main insect pest in tomato crop.

worldwide. The colonization of three endophytic bacteria, *Pantoea agglomerans* strain 33.1, *Burkholderia* sp. strain SCMS54 and *Burkholderia ambifaria* strain RZ2MS16, in tomato plants and *T. absoluta* larvae. *P. agglomerans* presented good results, colonizing tomato plants and *T. absoluta* larvae. Fluorescence microscopy images showed that this bacterium colonizes cells of the leaf parenchyma, tissue preferentially eaten by *T. absoluta* larvae. Electrocompetent cells of *P. agglomerans* were transformed with plasmid L4440: target genes of *T. absoluta* (*glutathione S-transferase epsilon 2*, *chitin synthase A* and *juvenile Hormone inducible protein*), but were not inducible to produce dsRNA. The caterpillars did not present differences in larval mortality when feeding on "Micro-Tom" tomato plants inoculated with these bacteria. Future works may exploit this bacterium specie for dsRNA production.

Keywords: Microorganism; *Pantoea agglomerans*; Colonization; Tomato leafminer

4.1. Introdução

Diversos microrganismos, principalmente bactérias e fungos, estão sendo identificados e modificados para uso em aplicações biotecnológicas. Pelo fato de ocuparem um nicho ecológico semelhante aos ocupados por pragas e patógenos, os microrganismos endofíticos são potenciais agentes de controle biológico (Azevedo et al., 2002; Berg et al., 2004). Os microrganismos endofíticos são os que habitam o interior da planta hospedeira, sem causar danos aparentes ou estrutura externa visível (Azevedo e Araújo, 2007). A presença de microrganismos endofíticos no interior da planta hospedeira pode aumentar a aptidão e desempenho da planta, protegendo-a contra pragas e patógenos, melhorando seu crescimento e aumentando a resistência em ambientes com estresses (Azevedo et al., 2000, Scherwinski et al., 2007). Além da ocorrência natural de endofíticos, é possível desenvolver estratégias de controle a partir de bactérias endofíticas por modificações genéticas (Rampelotti-Ferreira et al., 2010; Quecine et al., 2014). Essas bactérias estão presentes em todas as espécies vegetais e podem colonizar ativamente de forma local ou sistêmica, ou então permanecendo em estado de latência, sendo capazes de ajudar a planta no crescimento e controle de pragas e doenças (Azevedo et al., 2002; Bloemberg e Lugtemberg, 2001; Dobbelaere et al., 2003; Lodewyckx et al., 2002).

Um método de entrega que pode ser utilizado eficientemente, principalmente para insetos que apresentam recalcitrância a técnica de RNAi, é o oferecimento de bactérias expressando dsRNA, como a *Escherichia coli* HT115 (D3). Tian et al. (2009) alimentaram lagartas de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) com bactérias *E. coli* HT115 (DE3), que expressavam dsRNA correspondente a um gene da quitina sintase A (*SeCHSA*), as quais foram acrescidas a dieta artificial. As lagartas alimentadas com bactérias expressando dsRNA apresentaram alteração no desenvolvimento e tiveram mortalidade superior em comparação

com o tratamento controle, bem como apresentaram redução da expressão do gene *SeCHSA*. Bactérias poderiam ser utilizada como método de entrega de dsRNA para insetos da Ordem Lepidoptera, que apresentam recalcitrância a técnica de RNAi (Zhang et al., 2013; Yang e Zhao, 2014; Ganbaatar et al., 2017). As bactérias oferecem uma forma de proteção a molécula de dsRNA até que esta atinja o tecido no qual o gene alvo está sendo expresso e o mecanismo de interferência de RNA aconteça.

Murphy et al. (2016) transformaram leveduras para expressarem dsRNA, utilizando-as como método de entrega de dsRNA para *Drosophila* sp. Os autores argumentam que escolheram a levedura para ser o veículo de entrega de dsRNA pois essas crescem naturalmente na superfície de frutos, constituem um importante componente do microbioma de *Drosophila* sp. e produzem voláteis que a atraem. Assim, este “bioinseticida” de levedura naturalmente atraente pode entregar dsRNA a praga sem a necessidade de transformação de plantas. A aplicação da levedura transformada diminuiu a sobrevivência larval, a atividade locomotora dos adultos e afetou a capacidade reprodutiva de *Drosophila suzukii*.

Neste sentido e pensando na aplicabilidade da utilização de bactérias que se desenvolvam no mesmo hábitat de insetos-pragas, estudou-se a colonização de bactérias endofíticas em plantas de tomateiro para posterior transformação e utilização como estratégia e método de entrega de dsRNA para silenciamento de genes alvo de *Tuta absoluta*.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Material vegetal e Insetos

Foram utilizadas plantas de tomateiro do cultivar “Micro-Tom”, mantidas em casa-de-vegetação do Laboratório de Melhoramento de Plantas, CENA/USP. As lagartas de *Tuta absoluta* utilizadas nos experimentos foram provenientes de criação estabelecida no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP.

4.2.2. Bactérias endofíticas

As bactérias endofíticas utilizadas foram *Pantoea agglomerans* linhagem 33.1 e *Burkholderia* sp. linhagem SCMS54 e *Burkholderia ambifaria* linhagem RZ2MS16, cedidas gentilmente pela Prof^a Dra. Maria Carolina Quecine Verdi do Grupo de Genética Molecular

do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo" – Departamento de Genética – ESALQ/USP. Essas três bactérias expressavam o gene *GFP* (*green fluorescent protein*), clonadas em diferentes plasmídeos (Tabela 1). O gene *GFP* foi utilizado como um biomarcador, permitindo a identificação das bactérias na planta.

Tabela 1. Bactérias endofíticas transformadas com gene GFP (*green fluorescent protein*) e seus respectivos plasmídeos.

Bactéria	Plasmídeo	Referência
<i>Pantoea agglomerans</i> linhagem 33.1	pNK:GFP	Quecine, 2010
<i>Burkholderia</i> sp. linhagem SCMS54	pCM88:GFP	Ribeiro, 2013
<i>Burkholderia ambifaria</i> linhagem RZ2MS16	pCM88:GFP	Batista, 2012

Após a identificação da espécie de bactéria endofítica que melhor colonizava as folhas de tomateiro “Micro-Tom” e lagartas de *T. absoluta*, foi cedida também pela Prof^a Dra. Maria Carolina Quecine Verdi a mesma espécie/linhagem desprovida da construção contendo GFP, que foi utilizada posteriormente para transformação com plasmídeo de silenciamento. Todas essas bactérias possuem crescimento ótimo a 28°C. As bactérias foram multiplicadas em meio de cultura Luria Bertani (LB) e armazenadas em microtubos, sendo metade do volume de bactérias em meio LB e metade de glicerol 50%. Os microtubos foram armazenados em ultrafreezer a -80°C.

4.2.3. Colonização de bactérias endofíticas em plantas de tomate e lagartas de *Tuta absoluta*

Foram utilizadas plantas de tomate cultivar “Micro-Tom” e lagartas de *T. absoluta* provenientes de criação. Foi realizado o preparo dos inóculos das bactérias *P. agglomerans* 33.1: pNKGFP, *Burkholderia* sp. SCMS54: pCM88GFP e *B. ambifaria* RZ2MS16: pCM88GFP em meio líquido LB com antibiótico específico para cada uma das espécies (Tabela 2). Após 16 h de crescimento em meio líquido a 28°C a 150 rpm, foi realizada a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro. O valor esperado da densidade óptica na absorbância de 600 nm foi de 1,2, o que corresponde a 1×10^8 UFC de bactérias. Em seguida, foi realizada a diluição 1:10 e realizada a inoculação em plantas de “Micro-Tom”. Foram utilizados 20 mL de suspensão bacteriana por planta para inoculação, sendo 10 mL borrifados

sobre a parte aérea das plantas e 10 mL inoculados na base do caule da planta com o auxílio de uma micropipeta.

Tabela 2. Resistências a antibióticos por bactéria endofítica analisadas.

Bactéria cultivada	Antibiótico
<i>Pantoea agglomerans</i> 33.1: pNKGFP	Canamicina (50 µg mL ⁻¹)
<i>Burkholderia</i> sp. SCMS54: pCM88GFP	Tetraciclina (100 µg mL ⁻¹)
<i>Burkholderia ambifaria</i> RZ2MS16: pCM88GFP	Tetraciclina (100 µg mL ⁻¹)

4.2.4. Colonização de bactérias endofíticas em plantas de tomate “Micro-Tom”

Após o preparo do inóculo, foram inoculadas 10 plantas de “Micro-Tom” por cepa (*P. agglomerans* 33.1: pNKGFP; *Burkholderia* sp. SCMS54: pCM88GFP e *B. ambifaria* RZ2MS16: pCM88GFP) e 10 plantas inoculadas com meio líquido LB como controle negativo. Sete e quatorze dias após a inoculação, foi realizado reisolamento das bactérias de tecido foliar. Para isto, foram coletados, com pinça autoclavada, 1 g de amostra vegetal (folhas e pecíolos foliares) de cada uma das plantas de cada tratamento separadamente. Em seguida, em fluxo laminar, as amostras de folhas foram lavadas sucessivamente em 1 min em 70% etanol, 2 min em solução 2,5% hipoclorito de sódio comercial, 1 min em 70% etanol 1 min em água destilada autoclavada e, por fim, mais 1 min em água destilada autoclavada.

Após as etapas de lavagem, 100 µL da água da segunda lavagem foram plaqueados em placa 10% TSA (agar triptona de soja; composição: triptona 15g L⁻¹, digestão papaica de soja 5g L⁻¹, cloreto de sódio 5g L⁻¹ e agar 15g L⁻¹) com antibiótico e 50 mg mL⁻¹ fungicida benomyl (Benlate), com a finalidade de verificar a eficiência das sucessivas lavagens. Após as lavagens, as folhas foram maceradas em tampão fosfato salino (PBS) contendo 1,44 g L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,24 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,2 g L⁻¹ de KCl e 8 g L⁻¹ de NaCl, pH 7,4, com o auxílio de cadinho e pistilo autoclavados. O macerado foi transferido para tubo Falcon (50 mL), que ficou sob agitação por 30 min a 28°C e 150 rpm. Após o período de crescimento, em cada uma das amostras foi plaqueada uma alíquota de 100 µL das diluições 1 x 10⁰, 10⁻¹ e 10⁻². Cada amostra constou de triplicata técnica de cada uma das diluições. As placas foram mantidas em câmaras de crescimento a 30°C durante três dias, para contabilização do número de UFCs (unidades formadoras de colônia), sendo considerado o formato típico da UFC para diferenciação das espécie/linhagens das bactérias endofíticas.

4.2.5. Microscopia de Fluorescência

Após treze dias da inoculação das plantas, folhas de cada um dos tratamentos (*P. agglomerans* 33.1: pNKGFP; *Burkholderia* sp. SCMS54: pCM88GFP e *B. ambifaria* RZ2MS16: pCM88GFP) e do controle negativo foram removidas, cortadas longitudinalmente e condicionadas em lâminas de microscópio e observadas imediatamente em microscópio de fluorescência. As células bacterianas nos tecidos foliares do “Micro Tom” foram analisadas sob microscópio de epifluorescência modelo Axiophot II (Zeiss). As imagens foram digitalizadas por meio da câmera PCO CCD usando *ISIS software* (Metasystems).

4.2.6. Colonização de bactérias endofíticas em lagartas de *Tuta absoluta*

Foram utilizadas as bactérias *P. agglomerans* 33.1: pNKGFP e *Burkholderia* sp. SCMS54: pCM88GFP que apresentaram resultado positivo na colonização da parte aérea da planta de tomateiro “Micro-Tom”. O preparo do inóculo e a inoculação nas plantas seguiram as descrições do item 4.2.4. Após 24 h da inoculação das plantas de “Micro-Tom” em cada uma das 10 plantas de cada tratamento (*P. agglomerans* 33.1: pNKGFP e *Burkholderia* sp. SCMS54: pCM88GFP e controle negativo - inoculação de 20 mL de meio LB), foram dispostas 40 lagartas de *T. absoluta* com auxílio de pincel. Após a exposição das lagartas, as plantas de “Micro-Tom” foram cobertas com tecido “voile” e armazenados em câmaras climatizadas com temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14h.

Aos cinco, sete, nove e onze dias após a inoculação, foram realizados reisolamentos da parte aérea de cada planta (amostras de 1 g de folhas e pecíolos) e de lagartas que se alimentavam dessas plantas (amostra de 20 lagartas por planta). O reisolamento da parte aérea das plantas foi realizado como descrito em 4.2.4. No reisolamento das lagartas, foram realizadas adaptações para se adequar às necessidades do material trabalhado, como: a) adaptação de tubo para coleta e lavagem de lagartas; b) a maceração foi realizada em microtubo de 1,5 mL com auxílio de pistilo de tamanho reduzido e; c) foram utilizados 400 μL de meio PBS na maceração. Após o plaqueamento, as placas foram mantidas em incubadoras a 30°C durante três dias, para avaliação das UFCs. Em seguida, as placas de cada tratamento foram observadas e contabilizadas as UFCs (como descrito em 4.2.4). Foram coletadas amostras das colônias e estas estocadas em tubos de eppendorf em glicerol 50% e

armazenadas em ultrafreezer a -80°C , para posterior extração de DNA das bactérias e confirmação da espécie por meio de PCR com *primers* específicos.

4.2.7. Reação de PCR de colônia para confirmação de bactérias endofíticas provenientes de reisolamento

As bactérias endofíticas proveniente das placas dos reisolamentos de plantas e lagartas que estavam armazenadas em ultrafreezer -80°C foram cultivadas separadamente em placas de meio LB sólido com canamicina ($50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) a 28°C por 16 h. Em seguida, uma colônia de cada placa foi inoculada em 4 mL de meio LB líquido acrescentado de canamicina, sob agitação de 180 rpm por 16 h à 28°C . Após este período, 1 μL de cultura bacteriana foi coletado e transferido para microtubo de 500 μL , contendo 9 μL de água deionizada autoclavada. Em seguida, os microtubos foram colocados em termociclador Veriti (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA) a 95°C por 10 min. As reações de PCR foram realizadas com *primers* do plasmídeo pNKGFP (5' – CCTTCA TTACAGAAACGGC- 3') e PPNKRII (5'- GGTGATGCGTGATCTGATCC -3'). Na sequência, foram acrescentados aos microtubos os componentes da reação de PCR para um volume final de 25 μL de reação: 3,75 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 M de cada *primer*, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas) e tampão $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A amplificação foi realizada em termociclador, empregando as seguintes condições térmicas: 94°C por 45 s, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C por 45 s e 72°C por 30 s, finalizando à 72°C por 7 min. Em seguida as amplificações serão analisadas por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão TAE.

4.2.8. Transformação de bactéria endofítica com plasmídeo L4440: gene alvo de *Tuta absoluta*

A partir da bactéria endofítica *P. agglomerans* 33.1 (selvagem), que melhor colonizou lagartas e plantas de tomate “Micro-Tom”, foram realizadas culturas eletrocompetentes. Isto se deu a partir da inoculação de uma cultura bacteriana em 5 mL de meio LB líquido, incubados a 28°C por 18 h a 150 rpm. Após o crescimento, 1 mL da cultura foi transferido para 50 mL de LB e incubados a 28°C a 180 rpm até atingir $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,7$, mensurada em espectrofotômetro. Em seguida, o meio foi centrifugado a 3.000 g por 10 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em água deionizada esterilizada

e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano ressuspenso em glicerol 10% e centrifugado para diluição de 500X e distribuídos em alíquotas de 100 µL para estocagem a -80°C até o momento da transformação.

Então, fragmentos de genes de *T. absoluta* já clonados anteriormente no plasmídeo de silenciamento L4440, conforme item 3.2.5.1, e encontravam-se conservado a -80°C no Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP foram utilizadas para transformação da bactéria endofítica. Assim, os plasmídeos L4440:gene alvo selecionados (*glutathione S-transferase epsilon 2*; *chitin synthase A*; *juvenil Hormone inducible protein*) foram quantificados e então, 100 ng adicionados a 100 µL da cultura eletrocompetente para indução por eletroporação (Gene Pulser, BioRad, -2,5kV, 25µF, 200Ω, cubetas de 0,2 cm). As células eletroporadas foram plaqueadas e incubadas por 18 h a 28°C em meio sólido LB com ampicilina (100 mg mL⁻¹). Os clones foram repicados em meio LB líquido com os mesmos antibióticos a 37°C, por 16 h em agitação. Após este período, as bactérias transformadas foram confirmadas por PCR de colônia com os *primers* específicos para cada gene (Tabela 10) e com as mesmas condições de reação utilizadas descritos no item 4.2.7.

4.2.9. Avaliação do efeito de bactéria endofítica transformadas com plasmídeo pL4440: gene *T. absoluta*

Plantas de “Micro-Tom” foram inoculadas com *P. agglomerans* (33.1) transformadas com plasmídeo L4440 com genes alvo *glutathione S-transferase epsilon 2*; *chitin synthase*; *juvenil Hormone inducible protein*. Para isso, as bactérias transformadas, foram cultivadas em meio líquido LB com ampicilina (100 mg mL⁻¹) por 16h, a 28°C sob agitação. Após este período, as bactérias foram inoculadas em 2 L de meio de cultura LB, sendo diluído 100X, e mantidas em crescimento, sob agitação e a 28°C até atingir OD_{600nm} = 0,4. Foi acrescido ao meio de cultura IPTG (concentração final 0,4 mM) e incubado a 28°C, sob agitação, por aproximadamente 4 h até atingir OD_{600nm} = 1,2. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 10.000 g por 2 min para coleta das bactérias, e ressuspenso em 20 mL de água miliQ autoclavada. Em seguida, a suspensão foi diluída 10X e inoculada em dez plantas de tomate “Micro-Tom”, conforme descrito em 4.2.3. Como controle negativo, foram inoculadas dez plantas de tomate “Micro-Tom” com bactérias *P. agglomerans* (33.1) não transformadas e outras dez plantas sem inoculação. Após 24 h, foram distribuídas aleatoriamente 30 lagartas de *T. absoluta* em cada planta sobre folhas adultas.

As plantas de “Micro-Tom” foram cobertas com tecido “voile” e mantidas em câmaras climatizadas com temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14 h. Após um período de 15 dias, foram contabilizados o número de pupas por planta de cada tratamento, avaliando assim a viabilidade larval e comparando às das plantas do controle (sem inoculação de bactérias ou inoculadas com bactérias endofíticas não transformadas). Alíquotas de 1,5 mL de solução bacteriana foram coletadas e armazenadas (-20°C) antes e depois da indução com IPTG para posterior extração e confirmação da produção de dsRNA pelas bactérias.

4.2.10. Análises Estatísticas

Para o experimento de colonização de bactérias (item 4.2.4), o modelo linear generalizado misto de Poisson foi ajustado aos dados de UFC, incluindo os efeitos fixados de espécies de bactérias, tempo e a interação entre as espécies de bactérias e o tempo. As médias de UFC das espécies de bactérias foram comparadas usando intervalo de confiança assintótico de 95%. Para o experimento de colonização de lagartas (item 4.2.6) o modelo de Quasi-Poisson foi ajustado aos dados, incluindo os efeitos da espécie de bactéria. As médias de UFC das espécies de bactérias foram comparadas usando intervalo de confiança assintótico de 95%. A viabilidade larval (item 4.2.10) dos tratamentos foi comparada pela análise de desvios pelo modelo linear generalizado binomial com $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico R (R Core Team, 2017).

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Colonização de bactérias endofíticas em plantas de tomateiro “Micro-Tom”

Aos sete dias após inoculação, a cepa *Burkholderia* sp. SCMS54:pCM88GFP apresentou maior média de UFCs por 100 μL de meio PBS e maior número de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) por grama de tecido (Tabela 3). *Pantoea agglomerans* 33.1. *agglomerans*:pNKGFP, apesar de numericamente apresentar o segundo maior valor de UFC por 100 μL de tampão PBS, este não diferiu estatisticamente do valor de *Burkholderia ambifaria* RZ2MS16: pCM88GFP (Tabela 3). Aos quatorze dias, no reisolamento de folhas de tomateiro “Micro-Tom” verificou-se maior valor de UFC/g de tecido para *Burkholderia* sp. SCMS54:pCM88GFP. As cepas *P. agglomerans* 33.1:pNKGFP e *Burkholderia ambifaria*

RZ2MS16 apresentaram colonização, porém em número significativamente menor de UFC/g de tecido que *Burkholderia* sp. SCMS54 (Tabela 4).

No reisolamento de folhas de tomateiro “Micro-Tom” realizado aos sete e quatorze dias após inoculação, a análise estatística mostrou interação significativa de espécies de bactérias e efeito do tempo (Valor de verossimilhança= 25,76, d.f.= 2, $p < 0,0001$).

Tabela 3. Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) obtidas no reisolamento de folhas de tomateiro “Micro-Tom”, 7 dias após inoculação de bactérias endofíticas.

Bactéria	Nº médio de UFC/100 µL de meio PBS	Intervalo de confiança (95%) ²	UFC/g de tecido
<i>Burkholderia</i> sp. SCMS54: pCM88GFP	148,68 a ¹	(46,12; 479,28)	4460,4
<i>Pantoea agglomerans</i> 33.1.:pNKGFP	33,24 ab	(10,05; 109,98)	997,2
<i>Burkholderia ambifaria</i> RZ2MS16: pCM88GFP	2,8 b	(0,70; 11,15)	84

¹ Linhas seguidas pela mesma letra não diferem pela comparação assintótica dos intervalos de confiança, 95%.

² Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança obtido pela análise de modelo linear generalizado misto de Poisson.

Tabela 4. Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) obtidas no reisolamento de folhas de tomateiro “Micro-Tom”, 14 dias após inoculação de bactérias endofíticas.

Bactéria	Nº médio de UFC/100 µL de meio PBS	Intervalo de confiança (95%) ²	UFC/g de tecido
<i>Burkholderia</i> sp. SCMS54: pCM88GFP	282,48 a ¹	(46,12; 479,28)	8474,4
<i>Pantoea agglomerans</i> 33.1.:pNKGFP	2,12 b	(10,05; 109,98)	63,6
<i>Burkholderia ambifaria</i> RZ2MS16: pCM88GFP	0,57 b	(0,70; 11,15)	17,1

¹ Linhas seguidas pela mesma letra não diferem pela comparação assintótica dos intervalos de confiança, 95%.

² Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança obtido pela análise de modelo linear generalizado misto de Poisson.

4.3.2. Microscopia de fluorescência

Após 13 dias da inoculação das plantas com *P. agglomerans* 33.1.:pNKGFP; *Burkholderia* sp. SCMS54:pCM88GFP e *B. ambifaria* RZ2MS16:pCM88GFP, observou-se nos cortes longitudinais das folhas em microscopia de fluorescência que as células bacterianas

de *Burkholderia* sp. SCMS54 colonizam da epiderme das folhas de tomateiro “Micro-Tom” (Figura 3 A). A cepa *P. agglomerans* 33.1:pNKGFP foi encontrada colonizando as células do parênquima de folhas de “Micro-Tom” (Figura 3B). Devido ao fato de que lagartas de *T. absoluta* se alimentam do parênquima de folhas, a cepa *P. agglomerans* 33.1 indica maior probabilidade de ser ingerida pelas lagartas, indicando o potencial desta espécie como método de entrega de dsRNA gene alvo de silenciamento.

Figura 1. Imagem de microscopia de fluorescência. A- Corte longitudinal de folha de tomateiro “Micro-Tom” com setas indicando a presença de células da bactéria *Burkholderia* sp. SCMS54:pCM88GFP. B- Corte longitudinal de folha de tomateiro “Micro-Tom” com setas indicando a presença de células da bactéria *Pantoea agglomerans* 33.1:pNKGFP.

4.3.3. Colonização de bactéria endofítica em lagartas de *T. absoluta*

No reisolamento de bactérias nas folhas de “Micro-Tom”, aos cinco dias após a inoculação, verificou-se que *Burkholderia* sp. SCMS54:pCM88GFP foi recuperada com a maior média de UFCs que *P. agglomerans* 33.1:pNKGFP ($F_{1,28}=10,94$, $p=0,0026$, Tabela 5). Porém, no reisolamento de bactérias nas lagartas de *T. absoluta* aos cinco dias após a inoculação, *P. agglomerans* 33.1:pNKGFP apresentou maior média de UFCs recuperadas que *Burkholderia* sp. SCMS54:pCM88GFP ($F_{1,28}=4,86$, $p=0,00359$, Tabela 6).

Aos sete dias após a inoculação, no reisolamento de bactérias nas folhas de “Micro-Tom”, não foi observada diferença significativa entre o número médio de UFCs entre *Burkholderia* sp. SCMS54:pCM88GFP e *P. agglomerans* 33.1:pNKGFP ($F_{1,28}=0,52$, $p=0,4758$; Tabela 5). Porém, no reisolamento a partir de lagartas de *T. absoluta* aos sete dias, a

média de UFCs reisolada a partir da inoculação com *P. agglomerans* 33.1:pNKGFP foi maior que o com *Burkholderia* sp. SCMS54: pCM88GFP ($F_{1,28}=11,99$, $p= 0,0017$; Tabela 6).

Já no reisolamento de bactérias nas folhas de tomateiro “Micro-Tom”, aos nove dias após a inoculação, foi observado maior número de UFCs para *P. agglomerans* 33.1:pNKGFP ($F_{1,28}=4,00$, $p= 0,0553$; Tabela 5). No reisolamento das lagartas aos nove e onze dias após a inoculação de *Burkholderia* sp. SCMS54:pCM88GFP, não foram observadas UFCs, assim a análise de comparação estatística não pode ser realizada em razão do valor zero, apesar de *P. agglomerans* 33.1:pNKGFP apresentar valores de UFCs reisoladas (Tabela 6).

Tabela 5. Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) obtidas no reisolamento de folhas de tomateiro “Micro-Tom” aos 5, 7, 9 e 11 dias após inoculação de bactérias endofíticas em “Micro-Tom”.

Bactéria	Nº médio de UFC/100 µL de meio PBS ¹			
	5 dias	7 dias	9 dias	11 dias
<i>Burkholderia</i> sp. SCMS54: pCM88GFP	103,96 a (72,53; 149,028) ²	99,1 a (56,16; 147,87)	98,56 b (55,67; 179,49)	0
<i>Pantoea agglomerans</i> 33.1:pNKGFP	33,15 b (17,52; 479,28)	71,89 a (36,91; 140,04)	197,12 a (131,62; 295,22)	2,12

¹ Linhas seguidas pela mesma letra não diferem pela comparação assintótica dos intervalos de confiança, 95%.

² Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança obtido pela análise de modelo linear generalizado misto de Poisson.

Tabela 6. Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) obtidas no reisolamento de lagartas de *T. absoluta*, aos 5, 7, 9 e 11 dias após inoculação de bactérias endofíticas em “Micro-Tom”.

Bactéria	Nº médio de UFC/100 µL de meio PBS ¹			
	5 dias	7 dias	9 dias	11 dias
<i>Burkholderia</i> sp. SCMS54: pCM88GFP	10,63 b (3,22; 35,07) ²	1,26 b (0,63; 2,51)	0	0
<i>Pantoea agglomerans</i> 33.1:pNKGFP	41,08 a (22,39; 75,39)	194,95 a (101,80; 373,35)	44,5	2,34

¹ Linhas seguidas pela mesma letra não diferem pela comparação assintótica dos intervalos de confiança, 95%.

² Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança obtido pela análise de modelo linear generalizado misto de Quasi-Poisson.

Os resultados podem ser diretamente relacionados com o comportamento de alimentação de *T. absoluta* e às observações de microscopia de fluorescência, que demonstraram que *Burkholderia* sp. SCMS54:pCM88GFP coloniza a epiderme das folhas de

“Micro-Tom” e que *P. agglomerans* 33.1:pNKGFP coloniza as células do parênquima de folhas de “Micro-Tom”. Esta relação pode ser descrita da seguinte maneira: verificou-se que lagartas de *T. absoluta* ingerem as bactérias *Burkholderia* sp. SCMS54 no início do seu processo de alimentação foliar, pois se alimentam de células da epiderme das folhas para poder abrir galerias, resultando em um alto valor de UFCs no reisolamento de lagartas de *T. absoluta* aos cinco dias após inoculação. Porém, à medida que as lagartas penetram no parênquima foliar e permanecem se alimentando desse tecido, ingerem maior número de bactérias *P. agglomerans* 33.1:pNKGFP, resultando em maior média de UFCs de *P. agglomerans* 33.1: pNKGFP reisoladas das lagartas aos sete dias após a inoculação de bactérias. Então, aos nove e onze dias o número de UFCs de *P. agglomerans* 33.1:pNKGFP no reisolamento de lagartas de *T. absoluta* diminui devido à redução da disponibilidade de células do parênquima por conta do consumo voraz das lagartas de 3º e 4º ínstar.

Sendo assim, considerando a colonização de lagartas de *T. absoluta* pelas bactérias em razão do tempo de alimentação, observou-se que a espécie *P. agglomerans* apresenta valores de UFC/100 µL crescentes ao longo do tempo, diminuindo próximo do fim do ciclo larval de *T. absoluta* (9 e 11 dias), já que a duração média do ciclo larval a 25°C é aproximadamente 13 dias. Dessa maneira, a espécie *Pantoea agglomerans* foi escolhida para ser transformada e utilizada para expressão de dsRNA.

As colônias da bactéria *Pantoea agglomerans* 33.1: pNKGFP reisoladas de folhas de tomateiro e lagartas de *T. absoluta* foram confirmadas por reação de PCR de colônia (Figura 5).

Figura 5. Gel de eletroforese com produto de PCR de colônias obtidas em isolamento de folhas e lagartas após 5 dias da inoculação. M: Marcador molecular de 100 pb; 1: controle negativo da reação de PCR; 2: controle positivo - miniprep do pNKGFP (tamanho do amplicon - 362 pb); 3 a 9: colônias obtidas do isolamento de folhas de tomateiro “Micro-Tom”; 10 a 16: colônias obtidas do isolamento de lagartas de *Tuta absoluta*.

4.3.4. Avaliação do efeito de bactéria endofítica transformadas com plasmídeo pL4440: gene *T. absoluta*

Plantas de “Micro-Tom” foram inoculadas com *P. agglomerans* (33.1) transformadas com plasmídeo L4440 contendo fragmentos dos genes alvo *glutathione S-transferase epsilon 2*; *chitin synthase*; *juvenil Hormone inducible protein*. Como controle negativo, foram inoculadas dez plantas de tomate “Micro-Tom” com bactérias *P. agglomerans* (33.1) não transformadas e outras dez plantas sem inoculação. Após 24 h, foram distribuídas aleatoriamente 30 lagartas de *T. absoluta* em cada planta sobre folhas adultas.

Não foram verificadas diferenças na viabilidade larval entre os tratamentos e os controles (sem inoculação de bactérias e inoculando bactérias *P. agglomerans* linhagem 33.1 não transformadas; Tabela 7).

Tabela 7. Viabilidade larval de *Tuta absoluta* após aplicação de solução contendo bactérias endofíticas *Pantoea agglomerans* linhagem 33.1 transformadas, presumivelmente expressando dsRNA para silenciamento de genes, em plantas de “Micro-Tom”. Temperatura 25°C, fotoperíodo 14h:10h, UR 70%.

Tratamento	Viabilidade larval (%) $\pm$ EPM ⁴
Não tratado	63,3 $\pm$ 2,36
<i>Pantoea agglomerans</i> linhagem 33.1	63,6 $\pm$ 1,49
<i>Pantoea agglomerans</i> linhagem 33.1: pL4440 ¹ JHP	68,0 $\pm$ 3,59
<i>Pantoea agglomerans</i> linhagem 33.1: pL4440 ² CHI	60,7 $\pm$ 1,63
<i>Pantoea agglomerans</i> linhagem 33.1: pL4440 ³ GST	62,7 $\pm$ 6,94

¹ JHP: juvenile hormone inducible protein; ² CHI: chitin synthase; ³ GST: glutathione S-transferase epsilon 2

⁴ EPM: Erro padrão da média. Dados não significativos pela análise dos desvios, modelo linear generalizado ($p=0,76$).

Foi realizada extração para verificar se houve indução e produção de dsRNA das bactérias *Pantoea agglomerans* linhagem 33.1 transformadas com pL4440: genes (*juvenile hormone inducible protein*; *chitin synthase*; *glutathione S-transferase epsilon 2*) (Figura 6). A bactéria *Escherichia coli* HT115(DE3) transformada com pL4440: *glutathione S-transferase epsilon 2* induzida por IPTG foi utilizada como controle positivo do produto de extração de dsRNA.

Figura 6. Produtos da extração de dsRNA de bactérias. 1; HT115 (DE3) transformada pL4440:GST antes da indução com IPTG; 2 - HT115 (DE3) transformada pL4440:GST induzida com IPTG; 3 - *Pantoea agglomerans* linhagem 33.1 não transformada antes da indução com IPTG; 4 - *Pantoea agglomerans* linhagem 33.1 não transformada induzida com IPTG; 5 - *Pantoea agglomerans* linhagem 33.1 transformada pL4440: *glutathione S-transferase epsilon* (GST) antes da indução com IPTG; 6 - *Pantoea agglomerans* linhagem 33.1 transformada pL4440: GST induzida com IPTG; 7 - *Pantoea agglomerans* linhagem 33.1 transformada pL4440: *juvenile hormone inducible protein* (JHP) antes da indução com IPTG; 8 - *Pantoea agglomerans* linhagem 33.1 transformada pL4440:JHP induzida com IPTG; 9 - *Pantoea agglomerans* linhagem 33.1 transformada pL4440: *chitin synthase* (CHI) antes da indução com IPTG; 10 - *Pantoea agglomerans* linhagem 33.1 transformada pL4440:CHI induzida com IPTG.

Foi detectado produção de dsRNA somente na bactéria *E. coli* HT115(DE3) transformada com pL4440: *glutathione S-transferase epsilon 2* induzida por IPTG. As bactérias *Pantoea agglomerans* linhagem 33.1 transformadas com pL4440: genes (*juvenile hormone inducible protein*; *chitin synthase*; *glutathione S-transferase epsilon 2*) não apresentaram evidência de terem sido induzidas por IPTG, não produzindo dsRNA e, consequentemente, não havendo efeito dos tratamentos sobre a viabilidade larval.

Apesar desses resultados, o presente trabalho poderá servir como base para demais estudos, pois foi demonstrado que *P. agglomerans* coloniza plantas de tomateiro e lagartas de *T. absoluta*, podendo ser utilizadas como método de entrega de dsRNA. Porém, a metodologia de expressão de dsRNA em *P. agglomerans* deve ser ajustada, de modo que haja produção de dsRNA. Murphy et al. (2016) transformaram *Saccharomyces cerevisiae* de modo que o DNA plasmidial do vetor p406TEF1 possuísse sequências invertidas do gene alvo de *Drosophila suzukii* separadas por um íntron de 74 bp de *Drosophila melanogaster*, de modo a formar um dsRNA tipo *hairpin*. Com isso, foi possível que *S. cerevisiae* produzisse dsRNA do gene *y-Tubulin* e, consequentemente, a sua ingestão por larvas de *D. suzukii* reduzisse a sobrevivência larval, a atividade locomotora e a habilidade reprodutiva em adultos.

4.4. Conclusões

A bactéria endofítica *Pantoea agglomerans* coloniza plantas de tomateiro “Micro-Tom” e lagartas de *Tuta absoluta*, podendo ser utilizadas para transformação de bactérias que produzam dsRNA gene alvo de *T. absoluta* e como método de entrega de dsRNA para silenciamento por RNAi.

A transformação de *P. agglomerans* utilizando o plasmídeo pL4440, não foi induzível por IPTG, consequentemente não foi possível a produção de dsRNA gene alvo de *T. absoluta* nesta bactéria.

Referências

Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In Ganguli, B.N.; Deshmukh, S.K. (Eds) **Fungi: multifaceted microbes**. CRC press, 2007. p.189-207.

Azevedo, J.L.; Macheroni, J.W.; Pereira, J.O.; Araújo, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, p. 40-65, 2000.

Azevedo, J.L.; Maccheroni-Júnior, W.L.; Pereira, J.O. **Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais**. In: Serafini, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. (Org.). *Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. p. 233-268, 2002.

Batista, B.D. **Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**. Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2012. 129p.

Berg, G.; Krechel, A.; Ditz, M.; Sikora, R.A.; Ulrich, A.; Hallmann, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 215-229, 2004.

Bloemberg, G.V.; Lugtenberg, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 343-350, 2001.

Dobbelaere, S.; Vanderleyden, J.; Okon, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 22, p. 107-149, 2003.

Ganbaatar, O.; Cao, B.; Zhang, Y.; Bao, D.; Bao, W.; Wuriyanghan, H. Knockdown of *Mythimna separata* chitinase genes via bacterial expression and oral delivery of RNAi effectors. **BMC Biotechnology**, v. 17: 9, 2017.

Lodewyckx, C.; Vangronsveld, J.; Porteous, F.; Moore, E.R.B.; Taghavi, S.; Mezgeay, M., Van Der Lelie, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 583-606, 2002.

Murphy, K.A.; Tabuloc, C.A.; Cervantes, K.R.; Chiu, J.C. Ingestion of genetically modified yeast symbiont reduces fitness of an insect pest via RNA interference. **Scientific Reports**, v. 6, n. 22587, 2016.

Quecine, M.C. **Aspectos biotecnológicos da interação entre bactérias e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp., L.)**. Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2010. 196p.

Quecine, M.C.; Araújo, W.L.; Tsui, S.; Parra, J.R.P.; Azevedo, J.L.; Pizzirani-Kleiner, A.A. Control of *Diatraea saccharalis* by the endophytic *Pantoea agglomerans* 33.1 expressing cry1Ac7. **Archives of Microbiology**, v. 196, p. 227-234, 2014.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>. 2008.

Rampelotti-Ferreira, F.T.; Ferreira, A.; Vendramim, J.D.; Lacava, P.T.; Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. Colonization of rice and *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) larvae by genetically modified endophytic *Methylobacterium mesophilicum*. **Neotropical Entomology**, v.39, p.308-310, 2010.

Ribeiro, M.N.D. *Burkholderia* sp. cadmium tolerance mechanism and its influence in phytoremediation. PhD Thesis – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2013. 147p.

Scherwinski, K.; Wolf, A.; Berg, G. Assessing the risk of biological control agents on the indigenous microbial communities: *Serratia plymuthica* HRO-C48 and *Streptomyces* sp. HRO-71 as model bacteria. **Bio Control**, v. 52, p. 87-112, 2007.

Tian, H.; Peng, H.; Yao, Q.; Chen, H.; Xie, Q.; Tang, B.; Zhang, W. Developmental control of a Lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacterial expressing dsRNA of a non-midgut gene. **Plos One**, v. 4, e6225, 2009.

Yang, J.; Zhao, H. Efficiency of different methods for dsRNA delivery in Cotton Bollworm (*Helicoverpa armigera*). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, p. 115-123, 2014.

Zhang, X.; Liu, X.; Ma, J.; Zhao, J. Silencing of cytochrome P450 CYP6B6 gene of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) by RNAi. **Bulletin of Entomological Research**, v. 103, p. 584–591, 2013.