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

Identificação de ribonuclease potencialmente associada a degradação de dupla fita de RNA (dsRNA) em *Tuta absoluta* (Meyrick) e a eficiência no silenciamento gênico induzido pelo RNA de interferência (RNAi)

Anieli Baldo

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

Piracicaba
2020

Anieli Baldo
Engenheira Agrônoma

Identificação de ribonuclease potencialmente associada a degradação de dupla fita de RNA (dsRNA) em *Tuta absoluta* (Meyrick) e a eficiência no silenciamento gênico induzido pelo RNA de interferência (RNAi)

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

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

Piracicaba
2020

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

Baldo, Anieli

Identificação de ribonuclease potencialmente associada a degradação de dupla fita de RNA (dsRNA) em *Tuta absoluta* (Meyrick) e a eficiência no silenciamento gênico induzido pelo RNA de interferência (RNAi) / Anieli Baldo. - - Piracicaba, 2020.

74 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. RNA de interferência 2. Eficiência de RNAi 3. *Tuta absoluta* 4. Ribonuclease 5. *TaREase* I. Título

Dedicatória

Dedico essa dissertação aos amores da minha vida: meus pais Maria Aparecida e Jose Baldo, ao meu namorado Fabio, à minha irmã Ana Claudia, ao meu cunhado Wilian e à minha sobrinha e afilhada Ana Clara. Agradeço ao apoio e amor incondicional que me deram.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente pela minha vida e pela minha saúde. Agradeço a Ele por todas as portas que abriu, mas também por todas aquelas portas que Ele fechou, permitindo que um dia eu tivesse a oportunidade de vivenciar e concluir essa etapa exatamente nesse lugar. Tudo na vida tem Seu tempo, e eu agradeço a Deus por sempre cuidar de mim e me acompanhar na minha caminhada.

Agradeço à minha família, que são a razão do meu viver! Agradeço aos meus pais Maria Ap. e Jose Baldo, ao meu namorado Fabio Eduardo, à minha irmã Ana Claudia, ao meu cunhado Wilian e à minha sobrinha e afilhada Ana Clara. O apoio incondicional de vocês em todas as etapas da minha vida é o que me dá forças e razões para continuar em busca dos meus sonhos. Agradeço pelos ensinamentos dos meus pais, que sempre me mostraram o caminho da verdade, da honestidade e da humildade. Mãe e Pai, vocês são o meu maior exemplo na vida, e eu agradeço a Deus por ter pais tão maravilhosos quanto vocês. Ao meu namorado Fabio, eu só tenho a dizer obrigada pelo companheirismo de sempre. Obrigada por encarar esse desafio ao meu lado, de me dar apoio todos esses dias sem falhar, de me ajudar a concluir essa etapa e por fazer dos meus dias mais felizes e completos. À minha irmã Ana Claudia, agradeço por sempre me incentivar nos estudos, e à ela e ao meu cunhado agradeço pela oportunidade de me tornar tia e madrinha da pessoinha mais fofa da face da terra, o amor da minha vida, Ana Clara! Eu amo demais vocês!!!!

Agradeço à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade, suporte e estrutura de grande qualidade oferecidos.

Agradeço ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, pelo acolhimento, pelo suporte e pela estrutura de grande qualidade oferecidos.

Agradeço ao Prof. Figueira por me aceitar em seu laboratório, mesmo após alguns meses de início do meu mestrado, e por todas as lições e ensinamentos aprendidos nesses dois anos. Agradeço imensamente, professor, por essa oportunidade de aprender sobre o universo da Biologia Molecular e por toda a excelente estrutura que tive a honra de usufruir. Muito obrigada mesmo! Por tudo!

Agradeço ao Prof. Diego Riaño-Pachón (CENA/USP) por ter me auxiliado na utilização da Bioinformática para a realização da primeira etapa do meu projeto. Nunca irei esquecer que, quando o ano de 2018 estava prestes a virar, o senhor continuava respondendo meus e-mails prontamente, ajudando a sanar minhas dúvidas.

Agradeço ao Prof. José Roberto Postali Parra do Laboratório de Biologia de Insetos (ESALQ/USP) pela disponibilização da estrutura de seu laboratório para a realização do meu trabalho e por toda honra de poder aprender sobre Biologia de Insetos com a referência no assunto. Agradeço também por poder contar com a técnica de seu laboratório, Neide, que além de ser um poço de sabedoria, nos ajuda com tanta prontidão e ainda por cima é um amor de pessoa.

Agradeço aos professores que tive a honra de realizar as disciplinas do mestrado: Profa. Maria Carolina Quecine Verdi (Genética Molecular), Prof. Gabriel Rodrigues Alves Margarido (Biometria Aplicada à Genética e Bioinformática Aplicada), Prof. Francisco Scaglia Linhares (Desenvolvimento Molecular Vegetal), Profa. Helaine Carrer e Prof. Fabio Tebaldi Silveira Nogueira (Biologia Molecular de Plantas), Prof. Giancarlo Conde Xavier Oliveira (Evolução) e Prof. José Roberto Postali Parra (Biologia de Insetos). Todas essas disciplinas foram apresentadas de uma forma excelente e sou extremamente agradecida por ter tido essa oportunidade de aprender com as autoridades nesses assuntos.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) pela concessão da minha bolsa de mestrado.

Agradeço às pessoas que participaram mais ativamente do desenvolvimento do meu projeto e que, através de muitas trocas de experiência, me ajudaram a sanar minhas dúvidas. Ao Pós-doc do nosso laboratório, Eder Marques da Silva, por todos os seus ensinamentos na área da Biologia Molecular e por todas as lições compartilhadas comigo, sou extremamente grata por todo o seu auxílio durante o desenvolvimento da minha dissertação. Muito obrigada! À Bruna Garbatti Factor por sua amizade e por todos os ensinamentos na área de biologia molecular, entomologia e RNAi principalmente. Como eu sempre brinquei, é a nossa enciclopédia do RNAi rs. Além disso agradeço por todos os momentos que compartilhou palavras amigas e de motivação comigo. Obrigada, Bru! À Flavia de Moura Manoel Bento por se disponibilizar em tirar as minhas dúvidas sobre o projeto e por compartilhar sua experiência com *Tuta absoluta* e com os trabalhos de RNAi. À Daniele Paschoal por me ajudar nas análises de expressão e estatísticas da minha dissertação, além de outras tantas vezes em diversas questões, e também por sua amizade e apoio durante esses dois anos, pois sempre que precisava, você estava pronta para dizer uma palavra amiga, de conforto e de motivação. Obrigada, Dani! À Daniele Scotton por me ajudar sempre com as questões do laboratório e tirar dúvidas, principalmente quando eu estava transformando minhas bactérias. Também agradeço à ela por ser um ponto de apoio sempre que meu coração necessitava de um conforto. Obrigada, Dani S! Ao Rodolfo Augusto Maniero (o Rods!) por me ajudar também nas dúvidas sobre clonagem e na utilização de ferramentas legais de Bioinformática. Agradeço também à minha amiga Larissa Costa de Souza, que embarcou comigo na implementação de uma sala de criação de *Tuta absoluta* no CENA/USP e que se dedicou comigo a fazer dar certo! Obrigada pessoal, sucesso a todos vocês.

Agradeço aos técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/USP) por sempre me auxiliarem em tudo o que era necessário para o desenvolvimento do meu trabalho. Ao Felipe Buck Campana (o Fê =D), por desempenhar seu trabalho com grande dedicação e capricho e por sempre se disponibilizar a nos ajudar com o que for preciso! Ao Wlamir (o Mí rs) por ser “ponta firme” e sempre nos ajudar quando necessitamos, principalmente agradeço por me ajudar com a sala de criação de *Tuta absoluta*. E ao Paulo (o Paulão) pelo seu bom humor de sempre e por me ajudar com as questões das casas de vegetação.

Agradeço aos lampianos, que me acolheram tão bem: Eder, Larissa e Luis, meus companheiros de salinha de estudos que faziam dos meus dias mais alegres (o Eder sempre cantando e falando sozinho rs, o Luis que sempre alegrava com seu bom humor, a Larissa com sua delicadeza principalmente com os seus métodos educativos de Luis e Eder rsrs), a Bruna Factor, Dani Paschoal, Marília (grande companheira de final de mestrado), Rodolfo, Dani Scotton, Luciana, Laécio, Gabriel, Rafael Monteiro, Albania, Verusca e Lorena. Aos ICs que passaram pelo laboratório: Bruna Queiroz, Rafael Longo, Vitor, Gabriel, André, Barbara, Hugo. Pessoal, agradeço imensamente por ter tido vocês ao meu lado nessa jornada, nunca esquecerei os bons momentos que passamos juntos! Vou sentir muita falta de cada um de vocês e desejo à todos muuuito sucesso!! Obrigada!!

Enfim, agradeço à todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho!

Agradeço, agradeço e agradeço!

O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.

Isaac Newton

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Traça-do-tomateiro, <i>Tuta absoluta</i>	15
2.2. O mecanismo de interferência por RNA (RNAi)	18
2.3. Uso da técnica de RNA de interferência (RNAi) no controle de insetos-praga.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Criação de <i>Tuta absoluta</i>	29
3.2. Identificação de genes de ribonucleases potencialmente responsáveis pela degradação de dsRNA em <i>T. absoluta</i>	30
3.3. Análises <i>in silico</i> dos transcritos identificados como possíveis candidatos à REase de <i>T. absoluta</i>	31
3.4. Escolha e desenho de <i>primers</i>	32
3.5. Ensaio de fornecimento de dsGFP para análise de expressão	33
3.5.1. Dieta artificial de <i>Tuta absoluta</i>	33
3.5.2. Condições experimentais.....	34
3.5.3. Extração de RNA e síntese de cDNA das amostras de <i>T. absoluta</i>	36
3.5.4. Análise de RT-qPCR.....	37
3.6. Silenciamento gênico de <i>TaREaseI</i> utilizando dsRNA produzido por <i>Escherichia coli</i> HT115 (DE3).....	38
3.6.1. Extração de RNA de <i>T. absoluta</i> e síntese de cDNA.....	38
3.6.2. Clonagem dos fragmentos de dsRNA em vetor pGEM-T Easy.....	38
3.6.3. Clonagem dos fragmentos de dsRNA em vetor de silenciamento em plasmídeo L4440.....	39
3.6.4. Transformação em bactéria <i>Escherichia coli</i> HT115 (DE3).....	40
3.6.5. Alimentação de lagartas de <i>T. absoluta</i> com dieta artificial contendo dsRNA do gene AK + dsRNA do gene <i>TaREaseI</i> expresso por <i>Escherichia coli</i> HT115 (DE3)	41
3.7. Avaliação da forma de inoculação de <i>T. absoluta</i> em dieta artificial.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43

4.1. Identificação de genes de ribonucleases potencialmente responsáveis pela degradação de dsRNA em <i>T. absoluta</i>	44
4.2. Análises <i>in silico</i> dos transcritos identificados como possíveis candidatos à REase de <i>T. absoluta</i>	47
4.3. Ensaio de fornecimento de dsGFP para análise de RT-qPCR	51
4.4. Silenciamento gênico utilizando dsRNA produzido por <i>Escherichia coli</i> HT115 (DE3)	54
4.4.1. Amplificação e clonagem dos fragmentos de dsRNA em vetor pGEM-T Easy....	54
4.4.2. Clonagem dos fragmentos de dsRNA em vetor de silenciamento em plasmídeo L4440	55
4.4.3. Transformação em bactéria <i>Escherichia coli</i> HT115 (DE3)	56
4.4.4. Alimentação de lagartas de <i>T. absoluta</i> com dieta artificial contendo dsRNA do gene AK + dsRNA do up56 expresso por <i>Escherichia coli</i> HT115 (DE3).....	56
4.5. Avaliação da forma de inoculação de <i>T. absoluta</i> em dieta artificial	58
5. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62

RESUMO

Identificação de ribonuclease potencialmente associada a degradação de dupla fita de RNA (dsRNA) em *Tuta absoluta* (Meyrick) e a eficiência no silenciamento gênico induzido pelo RNA de interferência (RNAi)

A traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), nativa da América do Sul, é uma praga importante da família Solanaceae e uma das pragas economicamente mais devastadoras do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) no mundo. Foi identificada no Brasil na década de 1980 e invadiu a Europa em 2006, onde se alastrou por importantes regiões produtoras de tomate, causando grandes prejuízos. Sua principal forma de controle consiste na utilização de inseticidas químicos, porém o uso indiscriminado desses produtos tem levado a perda de eficácia e a resistência de *T. absoluta* tem sido relatada. Portanto, a busca por formas alternativas de controle desse inseto-praga se faz necessária e a utilização da técnica de RNAi (RNA interferente) tem se demonstrado como alternativa de grande potencial para o controle de *T. absoluta*. O RNAi consiste em um mecanismo de regulação pós-transcricional em nível de mRNA, levando ao silenciamento gênico desencadeado após a exposição a moléculas de RNA fita dupla (dsRNA). Contudo, é conhecido que a utilização dessa técnica apresenta variação entre as ordens e espécies de insetos, e a ordem Lepidoptera tem sido apontada como recalcitrante ao silenciamento gênico via RNAi. Nesse sentido, nucleases presentes no lumen do intestino dos insetos com a capacidade de degradação de dsRNA têm sido apontadas como possível mecanismo associado à recalcitrância dessa ordem ao RNAi. Recentemente, foi descrita a nuclease RNAi *efficiency related nuclease* (REase) que está presente no intestino médio de insetos da ordem Lepidoptera e que são capazes de digerir moléculas de dsRNA antes que sejam processadas pela enzima *Dicer*, afetando assim a eficiência do RNAi. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo a busca em transcriptoma de *T. absoluta* por ribonucleases como a recém descoberta REase e a investigação de sua relação com a eficiência do uso da técnica de RNAi nesse inseto-praga. Após a busca de sequências, foram identificados cinco contigs dos quais três continham o domínio PIN característico e após análises filogenéticas, foi constatada a presença de dois integrantes da nova família de proteínas REase, denominados de *TaREaseI* e *TaREaseII*, em *T. absoluta*. Esse é o primeiro relato da presença de mais de um membro dessa família de proteínas em uma espécie da ordem Lepidoptera. Entretanto, a análise de expressão relativa de *TaREaseI* e *TaREaseII* após a exposição a moléculas de dsRNA homólogas a regiões do gene codificador da proteína fluorescente GFP não demonstrou diferenças significativas de expressão.

Palavras-chave: RNA de interferência, eficiência de RNAi, *Tuta absoluta*, ribonuclease, *TaREase*

ABSTRACT

Identification of ribonuclease potentially associated with double stranded RNA (dsRNA) degradation in *Tuta absoluta* (Meyrick) and efficiency in gene silencing induced by RNA interference (RNAi)

The tomato leafminer *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), native to South America, is an important pest of the Solanaceae family and one of the most economically devastating pests of tomato (*Solanum lycopersicum*) in the world. This pest was identified in Brazil in the 1980s and invaded Europe in 2006, where it spread to important tomato-producing regions, causing great losses. The main control strategy is the use of chemical insecticides, but the indiscriminate use of these products has led to a loss of effectiveness and the resistance of *T. absoluta* has been reported. Therefore, the search for alternative approaches to control this insect pest is necessary and the use of the RNAi (interfering RNA) technique has been shown to be a great potential alternative for the control of *T. absoluta*. RNAi consists of a post-transcriptional regulation mechanism at the mRNA level, leading to gene silencing triggered by exposure to double-stranded RNA (dsRNA) molecules. However, it is known that the use of this technique varies between insect orders and species, and the Lepidoptera order has been identified as recalcitrant to gene silencing by RNAi. In this sense, nucleases present in the gut lumen of insects capable to degrade dsRNA have been identified as a plausible mechanism associated with the RNAi-recalcitrance of this order. Recently, the nuclease RNAi efficiency related nuclease (REase) has been described, that is present in the midgut of insects of the Lepidoptera order and which are capable of digesting dsRNA molecules before processing by the *Dicer* enzyme, affecting the efficiency of RNAi. Thus, this work aimed to search for ribonucleases in the *T. absoluta* transcriptome as the newly discovered REase and to investigate its relationship with the RNAi efficiency use of this technique in this insect pest. After searching for the sequences, five contigs were identified, and three presented the characteristic PIN domain., and after phylogenetic analyzes, the presence of two members of the new family of REase proteins, named as *TaREaseI* and *TaREaseII*, was identified in *T. absoluta*. This is the first report of the presence of more than one member of this protein family in a Lepidoptera order species. However, the relative expression analysis of *TaREaseI* and *TaREaseII* after exposure to dsRNA homologous to regions of the gene encoding the GFP fluorescent protein molecules did not demonstrate significant differences in expression.

Keywords: RNA interference, RNAi efficiency, *Tuta absoluta*, ribonuclease, *TaREase*

1. INTRODUÇÃO

A traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), nativa da América do Sul, é uma praga importante da família Solanaceae e uma das pragas economicamente mais devastadoras do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) no mundo (DESNEUX et al., 2010; CIFUENTES; CHYNOWETH; BIELZA, 2011). Ganhou destaque no cenário mundial após ter sido detectada no leste da Espanha no final de 2006, posteriormente se espalhando por toda a Europa, causando perdas consideráveis aos produtores de tomate, com populações do inseto atingindo rapidamente níveis prejudiciais (DESNEUX et al., 2010). Seu ciclo de vida compreende quatro fases de desenvolvimento, sendo estas as fases de ovo, larva, pupa e adulto (URBANEJA et al., 2013). As fêmeas adultas ovopositam preferencialmente nas folhas, onde as larvas jovens recém eclodidas penetram e se alimentam. Esse hábito leva à formação de galerias no mesófilo das plantas, causando sérios danos aos tecidos fotossintéticos, e consequentemente diminui a produção. Além disso, a ovoposição pode ocorrer diretamente nos frutos, levando a perdas ainda maiores ocasionadas pelo dano direto ao produto de interesse e indireta devido a infecção dos ferimentos por patógenos oportunistas (CIFUENTES; CHYNOWETH; BIELZA, 2011).

No Brasil, a *T. absoluta* foi identificada na década de 1980, e desde então se alastrou por todas as regiões produtoras de tomate, causando grandes prejuízos (GUEDES; PICANÇO, 2012). Suas formas de controle baseiam-se principalmente em controle químico com inseticidas e os principais compostos utilizados são os piretróides, organofosforados, benzoiluréia, abamectina e o tiocarbamato (MAPA, 2020). Porém, o uso intensivo desses produtos provocou a perda da eficácia dos inseticidas e o desenvolvimento de resistência por este inseto-praga tem sido relatado (SALAZAR; ARAYA, 1997; SIQUEIRA; GUEDES; PICANÇO, 2000a, 2000b; SIQUEIRA et al., 2001; LIETTI; BOTTO; ALZOGARAY, 2005; CAMPOS et al., 2014; RODITAKIS et al., 2018). Desse modo, a busca por formas alternativas de controle de *T. absoluta* se mostra de grande importância.

Nesse contexto, a tecnologia de RNA de interferência (RNAi) pode se tornar uma alternativa potencial para o controle de *T. absoluta*, como já demonstrado anteriormente por Camargo et al. (2015, 2016) e Bento et al. (2019). O RNAi consiste em um mecanismo de regulação pós-transcricional, altamente conservado em eucariotos, que controla a expressão gênica em nível de mRNA nas células, desencadeado pela exposição a um RNA de fita dupla (dsRNA) que apresente homologia a alguma região de um gene-alvo (FIRE et al., 1998; CARTHEW; SONTHEIMER, 2009; ZHUANG; HUNTER, 2012; RODRIGUES; FIGUEIRA, 2016). A

entrega de moléculas de dsRNA homólogas a genes essenciais pode resultar em silenciamento gênico, levando a grandes prejuízos para a sobrevivência do organismo alvo (HUVENNE; SMAGGHE, 2009; WHYARD; SINGH; WONG, 2009). Após a confirmação do silenciamento gênico em insetos-praga por meio da ingestão de dsRNA de genes alvos expressos por plantas transgênicas e a consequente redução dos danos causados às plantas demonstrados por Baum et al. (2007) e Mao et al. (2007), a técnica de RNAi se tornou uma tecnologia de grande potencial como uma nova abordagem para o controle de pragas e desde então vem sendo avaliada para sua aplicação em diversas espécies.

Porém, a eficiência do uso da técnica de RNAi depende da sensibilidade e da resposta bem-sucedida ao silenciamento gênico desencadeado pelo dsRNA, sendo a principal restrição para a utilização dessa técnica no controle de insetos-praga (TERENIUS et al., 2011; JOGA et al., 2016). Nesse aspecto, é conhecido que a eficiência desse mecanismo apresenta variação entre as diversas ordens e até mesmo espécies de insetos, destacando-se como principais fatores responsáveis por essa variação os gene-alvos do silenciamento, o método de entrega de dsRNA utilizado, características fisiológicas da espécie, o mecanismo de captação e transporte de dsRNA, a ausência ou não de resposta sistêmica de RNAi, a taxa de processamento do dsRNA em siRNAs, a presença ou não de nucleases digestivas de dsRNA, entre outras (TERENIUS et al., 2011; YANG; HAN, 2014a; JOGA et al., 2016; RODRIGUES; FIGUEIRA, 2016; GUAN et al., 2018a, 2018b; COOPER et al., 2019). O uso da tecnologia de RNAi tem alcançado melhores resultados para algumas ordens de insetos, destacando-se como mais eficientes à resposta ao RNAi as ordens Coleoptera, Orthoptera e Hemiptera em que, no geral, um alto grau de silenciamento gênico por dsRNA tem sido demonstrado (BAUM et al., 2007; SANTOS; VANDEN BROECK; WYNANT, 2014; SPIT et al., 2017). Já algumas ordens, como a ordem Lepidoptera, tradicionalmente apresentam maior recalcitrância ao silenciamento gênico via RNAi, possivelmente devido à ação de ribonucleases e fatores do ambiente do trato digestório e da hemolinfa desses insetos (IVASHUTA et al., 2015).

Um fator importante que deve ser considerado ao utilizar a técnica de RNAi é a necessidade de que a molécula de dsRNA se mantenha estável até atingir as células do intestino médio do inseto. Nesse sentido, acredita-se que nucleases presentes no lúmen do intestino dos insetos possam desempenhar papel importante nessa variação encontrada à resposta ao RNAi, uma vez que estas enzimas podem ser responsáveis pela degradação de moléculas de dsRNA (PRENTICE et al., 2019). Recentemente, foi descrita a nuclease RNAi *efficiency-related nuclease* (REase), sendo proposta como o possível mecanismo associado à recalcitrância da ordem Lepidoptera ao RNAi (GUAN et al., 2018a). Foi demonstrada a existência de um gene específico

dessa ordem, o gene *up56*, que codifica a nuclease REase, que está presente no intestino médio desses insetos e que é capaz de digerir moléculas de dsRNA antes que seja processada pela enzima *Dicer*, afetando assim a eficiência do mecanismo de RNAi (GUAN et al., 2018a). Em trabalho posterior, foi demonstrado que um homólogo da REase em *Helicoverpa armigera* teve sua expressão aumentada na presença de dsRNA, corroborando os dados anteriormente demonstrados em *Ostrinia furnacalis* (GUAN et al., 2018a, 2019). Além disso, outras dsRNases têm sido reportadas em outras espécies e ordens de insetos e têm sido apontadas como possível mecanismo associado à baixa eficiência no silenciamento gênico desencadeado pela molécula de dsRNA (SPIT et al., 2017; PRENTICE et al., 2019; PENG et al., 2020).

Sendo assim, a necessidade de entender o papel dessas nucleases na resposta ao RNAi nas diversas espécies e ordens de insetos se mostra como estratégia de grande potencial na busca por melhores eficiências para a utilização dessa técnica no controle de insetos-praga. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi buscar em bancos de dados de transcriptoma de *T. absoluta* (CAMARGO et al., 2015) genes que codificavam nucleases, como a recém descoberta REase, potencialmente responsáveis pela degradação do dsRNA em lepidópteros, a fim de analisar a relação com a eficiência da técnica de RNAi para o controle de *T. absoluta*, além de analisar a expressão desses genes quando na presença de moléculas dsRNA.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta*

A traça-do-tomateiro foi originalmente descrita em 1917 por Meyrick como *Phthorimaea absoluta*, baseado em insetos coletados em Huancayo, no Peru. Posteriormente, a classificação genérica passou por diversas alterações até ser nomeada *Tuta absoluta* (POVOLNY, 1994). A *T. absoluta* é uma espécie pertencente à ordem Lepidoptera, subordem Ditrysia, superfamília Gelechioidea, família Gelechiidae e subfamília Gelechiinae (MICHEREFF et al., 2013). O ciclo de vida desse inseto compreende quatro estádios de desenvolvimento, sendo estas as fases de ovo, larva, pupa e adulto (URBANEJA et al., 2013). Os adultos são mariposas pequenas, com comprimento de 10-11 mm, apresentam coloração cinza-prateada, antenas filiformes e palpos labiais recurvados (COELHO; FRANÇA, 1987; HAJI et al., 1988). O comportamento dessa espécie é crepuscular-noturno-auroral, e durante o dia permanecem na face abaxial das folhas de tomateiro (COELHO; FRANÇA, 1987; SOUZA; REIS, 1992). Os insetos são multivoltinos, ou seja, se reproduzem várias vezes ao ano, e podem apresentar de 10 a 12 gerações em um ano (DESNEUX et al., 2010). A duração do ciclo de vida dessa espécie é dependente das condições ambientais, apresentando duração de 64 dias a 15°C, 35 dias a 20°C, 23 dias a 25°C e 18 dias a 30°C, em que 416,7 graus-dia devem ser atingidos para completar seu ciclo (KRECHEMER; FOERSTER, 2015). As fêmeas ovopositam individualmente nas nervuras dos folíolos em ambas as superfícies, nos brotos terminais, nas hastes, no cálice das flores e também nos frutos do tomateiro, com a ovoposição de 250 a 300 ovos por fêmea (COELHO; FRANÇA, 1987; SOUZA; REIS, 1992; UCHOA-FERNANDES; LUCIA; VILELA, 1995; EPPO, 2005; DESNEUX et al., 2010). Os ovos medem aproximadamente 0,4 mm de comprimento e 0,2 mm de diâmetro, são cilíndricos, de coloração branco-cremosa e logo após a ovoposição e perto da eclosão, se tornam amarelo-alaranjados (URBANEJA et al., 2013). Após a ovoposição, a eclosão de lagartas neonatas de *T. absoluta* leva em torno de 4 a 5 dias em temperatura de 25°C (KRECHEMER; FOERSTER, 2015).

As larvas jovens recém eclodidas penetram nos tecidos mais tenros e minam os folíolos, broqueiam o caule, perfuram as brotações apicais, e atacam os frutos podendo, em casos de ataques mais severos, levar a planta à morte (MICHEREFF et al., 2013). As lagartas apresentam coloração que pode variar de verde-clara a rosa, apresentando também uma placa escura na parte dorsal do primeiro segmento torácico. A fase larval compreende quatro estádios, com duração média de 13 a 15 dias (MICHEREFF et al., 2013) podendo variar em função da temperatura na qual as lagartas

se desenvolvem (Figura 1) (QUIROZ, 1976; SOUZA; REIS, 1992; GIUSTOLIN; VENDRAMIM; PARRA, 2002).

As pupas são obtectas, apresentam 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 no interior dos frutos ou no solo como pupa nua (COELHO; FRANÇA, 1987; SOUZA; REIS, 1992; EPPO, 2005). É nessa fase de pupa que normalmente a identificação dos sexos é possível utilizando como característica para separação o cremaster, onde nas fêmeas ocorre a invaginação com a formação de dois lóbulos e nos machos ele dá origem ao orifício anal (FERREIRA, 2011). O poro genital está localizado no 9º segmento abdominal nos machos e entre o 8º e 9º segmentos nas fêmeas (COELHO; FRANÇA, 1987). A fase de pupa tem duração média de sete dias (GIUSTOLIN; VENDRAMIM, 1996; BOGORNÍ; CARVALHO, 2006), apresentando viabilidade de 80% à uma temperatura de 25°C (COELHO; FRANÇA, 1987). Quando em baixas temperaturas, a fase de pupa se estende, podendo chegar a 19 dias (QUIROZ, 1976). A longevidade dos adultos tem duração média de 10 dias, podendo variar em função da temperatura do ambiente, do tipo de alimento na fase larval e do sexo, sendo que em geral, as fêmeas vivem mais que os machos (Figura 1) (COELHO; FRANÇA, 1987; HAJI et al., 1988; GIUSTOLIN; VENDRAMIM, 1996; FERREIRA, 2011). Em condições de campo, as fases da traça-do-tomateiro são sobrepostas, podendo ocorrer todas as gerações em um mesmo período em uma lavoura infestada (SOUZA; REIS, 1992).

A *T. absoluta* é considerada atualmente uma das principais pragas da cultura do tomate, sendo este o seu hospedeiro preferencial e no qual sua importância como inseto-praga é maior. Porém, essa praga atinge não somente a cultura do tomateiro, mas sim outras espécies cultivadas de Solanaceae, como a batata (*S. tuberosum* L.), a berinjela (*S. melongena* L.), o pimentão (*Capsicum annum* L.), o fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e o pepino doce (melão andino, cachum ou xachum - *S. muricatum*). Atinge também algumas espécies silvestres do gênero *Solanum*, *Datura* e *Nicotiana*, como por exemplo a maria-pretinha (*S. americanum* Mill.), o joá-bravo (*S. aculeatissimum* Jacq.), entre outras, e essas apresentam potencial de manter e permitir a dispersão dessa praga na entressafra do tomateiro (FRANÇA et al., 1992).

Esse inseto-praga tem origem Neotropical, originando-se e estando restrita à América do Sul até 2006, quando então foi reportado sua presença na Europa. Desde a sua primeira detecção na Espanha, esse inseto se espalhou por todo o continente e na região do Mediterrâneo, incluindo o norte da África e regiões do Oriente Médio. Acredita-se que sua introdução em novas regiões esteja ligada à importação de tomate de regiões contaminadas, com casos confirmados em outros países da Europa/Ásia como Reino Unido, Países Baixos, Rússia e Lituânia. Porém, dados de

amostragens com armadilhas de feromônio indicam que essa espécie possui capacidade de dispersão ativa (DESNEUX et al., 2011). Campos et al. (2017) demonstraram que, no período entre 2007 e 2017, a infestação de *T. absoluta* atingiu 60% da área plantada de tomateiro no mundo, o que significaria um acréscimo no raio de alcance em 800 km em cada ano neste período. Devido a esse rápido espalhamento e alto potencial de danos, Santana et al. (2019), além de demonstrarem a situação atual da distribuição global de *T. absoluta*, desenvolveram um modelo computacional CLIMEX que faz projeções para as áreas ameaçadas por *T. absoluta* atualmente e no futuro, permitindo assim que autoridades fitossanitárias dessas regiões tomem as devidas providências. Esse modelo computacional aponta como regiões altamente susceptíveis à invasão desse inseto-praga os Estados Unidos e a China, que detêm grande parte da produção mundial de tomate. Nesse sentido, a correta identificação de *T. absoluta* é importante, uma vez que a identificação pelos danos causados à cultura do tomate pode ser facilmente confundida com outros insetos-praga. Com o sequenciamento recente do genoma de *T. absoluta*, e o painel que conta com 21 SNPs como marcadores para diferenciar *T. absoluta* de espécies altamente relacionadas da mesma família (*Keiferia lycopersicella* e *Phthorimaea operculella*), é possível de realizar sua correta identificação (TABULOC et al., 2019).

Os danos causados pelo ataque de *T. absoluta* têm sido relatados como devastadores, atingindo níveis de perdas de 80 a 100% quando medidas de controle não são adotadas (DESNEUX et al., 2010). Esses danos são oriundos da formação de galerias no mesófilo das folhas pela alimentação das lagartas, o que diminui a capacidade fotossintética das plantas, levando à perdas consideráveis na produção (DESNEUX et al., 2010). Esses danos podem ser tão severos a ponto de causar uma desfoliação completa na planta (VARGAS, 1970). Apesar de existirem diversas táticas no manejo de *T. absoluta*, como o controle cultural, varietal e biológico, sendo a combinação desses métodos os mais indicados para o controle, o uso dos inseticidas químicos ainda é o método de controle mais comumente utilizado, inclusive nos países de recente introdução (DESNEUX et al., 2010; GUEDES; PICANÇO, 2012; HADDI et al., 2012). Porém, o hábito minador das lagartas faz com que essa praga seja um alvo difícil de se atingir, levando à falhas no controle e, conseqüentemente, ao aumento no número de aplicações, o que eleva os custos financeiros e ambientais (GUEDES; PICANÇO, 2012). Além disso, devido ao aumento no número de aplicações de inseticidas, relatos sobre populações resistentes às moléculas utilizadas para o controle de *T. absoluta* têm sido relatados (SALAZAR; ARAYA, 1997; LIETTI; BOTTO; ALZOGARAY, 2005). No Brasil, foram relatadas populações de *T. absoluta* que apresentaram resistência a diversas moléculas inseticidas utilizadas para o seu controle, como a abamectina

(SIQUEIRA; GUEDES; PICANÇO, 2000b), cloridrato de cartape (SIQUEIRA; GUEDES; PICANÇO, 2000b), metamidofós (SIQUEIRA; GUEDES; PICANÇO, 2000b), permetrina (SIQUEIRA; GUEDES; PICANÇO, 2000b), espinosade (CAMPOS et al., 2014) teflubenzurom e triflummurom (SILVA et al., 2011). Além disso, foi relatada também a resistência às moléculas da classe das diamidas, uma nova classe de inseticidas utilizados para o controle de lepidópteros (RODITAKIS et al., 2015). Nesse sentido, a busca por novas alternativas para o controle de *T. absoluta* é necessária, buscando além de um aumento da eficiência no controle que é atualmente baixo, mas também a redução no número de aplicações de inseticidas nas áreas afetadas, a diminuição de populações resistentes cada vez mais frequentes e ainda, a diminuição dos danos causados ao meio ambiente e à saúde humana.

Figura 1. Ciclo biológico de *Tuta absoluta*. Esquema mostrando as fases de desenvolvimento (ovo, lagarta, pupa e adulto), aparência e duração de cada fase e breve descrição dos danos causados (Fonte: Baldo, A.).

2.2. O mecanismo de interferência por RNA (RNAi)

RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo de regulação pós-transcricional, altamente conservado em eucariotos, que controla a expressão gênica em nível de mRNA nas células, desencadeado pela exposição a um RNA de fita dupla (dsRNA) que apresente homologia a uma região de um gene-alvo (FIRE et al., 1998; CARTHEW; SONTHEIMER, 2009; ZHUANG; HUNTER, 2012; RODRIGUES; FIGUEIRA, 2016). As primeiras manifestações do silenciamento gênico por RNA surgiram após uma tentativa de intensificar a cor púrpura de flores

de petúnia, onde dois grupos de pesquisadores inseriram cópias exatas dos genes responsáveis pela pigmentação (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990; VAN DER KROL et al., 1990). O resultado observado foi oposto ao esperado, com a produção de flores diversificadas ou até completamente brancas, ao contrário de flores com cores mais intensas (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990; VAN DER KROL et al., 1990). O fenômeno foi denominado de “co-supressão”, pois, tanto as cópias dos genes inseridos quanto os genes endógenos, foram silenciados. Posteriormente, Romano e Macino (1992) reportaram um fenômeno semelhante em *Neurospora crassa*, em que a expressão dos genes *al-1* e *al-3* foi reprimida após a introdução de sequências de RNA homólogas, sendo este fenômeno denominado de *quelling*. A primeira documentação desse fenômeno em animais foi descrita por Guo e Kemphues (1995), que inseriram cópias senso e antisenso do gene *par-1* de *Caenorhabditis elegans* e observaram que a resposta desse gene foi suprimida. Naquele momento, não se sabia ao certo o mecanismo responsável pelo desencadeamento da supressão da resposta do gene *par-1*, mas acreditava-se que o fenômeno era devido a uma hibridização da cópia antisenso com o mRNA do gene alvo, o que daria origem a uma molécula de dupla fita de RNA (dsRNA) e desencadearia a repressão de supressão. Porém, curiosamente essa mesma supressão da resposta do gene *par-1* foi observada quando da introdução da cópia senso desse gene. Para explicar tais fenômenos considerados paradoxais, Andrew Fire, Craig Mello e colaboradores (1998), testaram a hipótese de que a molécula responsável pelo desencadeamento da supressão de genes endógenos era a molécula de dsRNA. Para isso, testaram além da introdução de moléculas de dsRNA, a introdução de moléculas de RNA de fita simples (ssRNA) senso e antisenso cuidadosamente purificadas, e observaram que a supressão da resposta do gene endógeno das moléculas de ssRNAs senso e antisenso, eram de 10 a 100 vezes menores quando comparadas às moléculas de dsRNA. Assim, após cerca de 8 anos das primeiras manifestações do silenciamento gênico por RNA, o termo RNAi foi proposto pela primeira vez após o descobrimento nesses estudos com o nematoide *C. elegans*, de que o processo de silenciamento era desencadeado pelo fornecimento de dsRNA (FIRE et al., 1998).

O mecanismo de silenciamento gênico via RNAi se baseia na presença de pequenos RNAs não codantes (ncRNA), geralmente oriundos da clivagem de moléculas maiores de dsRNA que apresentam sequências homólogas a genes endógenos de um organismo. Quando presente em fungos, esse mecanismo é denominado *quelling*; nas plantas são denominados de PTGS (*post transcriptional gene silencing*) e quando presente em animais é denominado RNAi. Porém, apesar da denominação original distinta, todos compartilham um mecanismo determinante comum que

indica uma origem remota em um ancestral comum dos fungos, plantas e animais (FAGARD et al., 2000).

Existem diversas classes de pequenos RNAs, porém devido a características de origens, estruturas, proteínas efetoras associadas e a função biológica que desempenham, levaram ao reconhecimento de três classes como principais, sendo estas siRNA (*small interfering RNA*), miRNA (*micro RNA*) e piRNA (*piwi interacting RNA*) (Figura 2) (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009). O siRNA, ou pequeno RNA de interferência, é definido pelo seu pequeno número de pares de bases, apresentando de 20 a 30 pb, e por sua associação com uma proteína da família *Argonautas*, que juntos atuam no controle da expressão gênica (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009). Os siRNAs foram caracterizados como sendo originados de moléculas de dsRNA longos, lineares, perfeitamente complementares introduzidos no citoplasma ou absorvidos do ambiente (MELLO; CONTE, 2004). Os dsRNAs são então processados, vindo a formar os siRNAs que irão dirigir o silenciamento (MEISTER; TUSCHL, 2004). Originalmente, os dsRNAs foram observados no silenciamento induzido por vírus ou por exposição a transposons, e por esse motivo foi lhe atribuído um papel natural de defesa (MELLO; CONTE, 2004). Porém, outras fontes de siRNAs foram descobertas, como centrômeros e outras sequências repetitivas (LIPPMAN; MARTIENSSSEN, 2004) e, posteriormente, através de estudos funcionais em plantas, descobriram uma outra fonte de siRNA denominada de ta-siRNA (*trans acting siRNA*) os quais são produzidos pelo processamento de transcritos específicos e regulam um grupo restrito de genes (VAZQUEZ et al., 2004). Alguns anos mais tarde, foram descobertas novas fontes de siRNAs endógenos (endo-siRNAs) como RNAs mensageiros convergentes, fontes naturais de moléculas senso e antisenso, tais como pseudogenes e o mRNA de seu gene relativo, e o RNA do tipo *hairpin* (hpRNA) (GOLDEN; GERBASI; SONTHEIMER, 2008), o que ressalta o fato de que as fontes de siRNAs não são somente exógenas (exo-siRNAs) (Figura 2).

Os miRNAs são pertencentes a uma classe de sRNAs endógenos, apresentando de 20 a 24 nucleotídeos, sendo altamente abundante em plantas e animais. Sua biossíntese ocorre a partir da transcrição da classe de genes *MIR* pela RNA polimerase II. Esse transcrito primário, também chamado de precursor (pri-miRNA) é um RNA fita simples (ssRNA), longo e poliadenilado, que por meio do pareamento de bases de regiões complementares, forma uma estrutura secundária de dsRNA do tipo *hairpin* ou grampo. Essa molécula de pri-miRNA é processada no núcleo da célula através da ação de uma enzima do tipo RNase-III, denominada *Dicer* (DCL1) em plantas e *Drosha* nos animais, que realiza o processamento dessa molécula originando moléculas de dsRNA de 60-70 pb, denominados pre-miRNA. Esses pre-miRNAs são então exportados para o citoplasma

através da proteína HASTY em plantas, ortóloga da proteína ‘Exportina 5’ (Figura 2) (BARTEL, 2004).

Uma classe de moléculas de RNAi mais recentemente descoberta, os piRNAs, teve sua função elucidada como sendo responsável em assegurar a estabilidade de células germinativas atuando no silenciamento de transposons (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009). Quando observada em *Drosophila* atuando no silenciamento de sequências repetitivas, Aravin et al. (2001) denominaram-na de siRNAs associados a sequências repetitivas (*repeat associated siRNA*). Posteriormente, com a descoberta de uma classe destes siRNAs não associados com sequências repetitivas, foi renomeada para piwi-RNA (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009). Diferentemente dos miRNAs e dos siRNAs, os piRNAs são oriundos de um RNA fita simples e não requerem o processamento pela proteína *Dicer* para sua biossíntese. Eles podem ser um pouco mais longos, podendo atingir até 30 pb, e se associam com uma subfamília dentro das *Argonautas* denominadas de *Pimi* (Figura 2) (VAGIN et al., 2006).

Com exceção dos piRNAs, o processamento das moléculas de RNAi ocorre de forma gradual catalisado por uma endonuclease do tipo RNase III denominada *Dicer*, que é específica de dsRNA e que apresenta como principal característica a presença de dois domínios, um com atividade catalítica (RNase III) e outro de ligação ao dsRNA (dsRBD). Essa enzima se associa ao dsRNA no citoplasma, realizando o processamento do dsRNA em fragmentos de cerca de 21 a 24 pb (MEISTER; TUSCHL, 2004). As moléculas menores originadas, são então associadas a um complexo ribonucleoproteico com atividade nuclease denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*). O complexo RISC possui uma proteína da família *Argonautas*, e estas possuem como características marcantes um domínio de ligação ao RNA, denominado PAZ, e um domínio de atividade nuclease, denominado PIWI (CARMELL et al., 2002). Nesse complexo, uma das fitas do dsRNA é eliminada e a fita remanescente é a fita que irá guiar o reconhecimento de sequências de mRNA complementares alvo levando a degradação dessa sequência específica (MARTINEZ et al., 2002).

Figura 2. Enzimas chaves das três rotas de RNA de interferência (RNAi) em insetos. A – Rotas de *small interfering RNA* (siRNA) sintetizados a partir de fontes exógenas (Exo-siRNA) e endógenas (Endo-siRNA); B – Rota de micro RNA (miRNA) sintetizados a partir de genes *MIR* (miRNA *gene*); C - Rota de piwi RNA (piRNA) sintetizados a partir de fita simples de RNA (piRNA precursor) (Fonte: (COOPER et al., 2019).

2.3. Uso da técnica de RNA de interferência (RNAi) no controle de insetos-praga

Após a descoberta do fenômeno de silenciamento gênico via RNAi, essa técnica foi amplamente utilizada na genômica funcional, por meio do silenciamento de genes de interesse individualmente (BOUTROS; AHRINGER, 2008; PERRIMON; NI; PERKINS, 2010). Por proporcionar uma ação eficiente e gene-específica, a aplicação da técnica do silenciamento gênico via RNAi também se destacou como uma alternativa de grande potencial para o controle de pragas agrícolas, apresentando alta eficiência no controle e um impacto ambiental inferior às outras técnicas comumente utilizadas (PRICE; GATEHOUSE, 2008).

As primeiras formas originais de entrega de RNAi se basearam em microinjeção no corpo dos insetos de sistemas modelo e como alternativa utilizavam o embebimento (*soaking*) de células de insetos ou larvas individuais em solução contendo dsRNA (KOCH; KOGEL, 2014). Esses métodos são muito empregados para estudos de genômica funcional. Há diversas formas de entrega da molécula de dsRNA em insetos, incluindo microinjeções em ovos (QUAN; KANDA; TAMURA, 2002; FABRICK; KANOST; BAKER, 2004; TSUZUKI et al., 2005; LIU et al., 2008; MASUMOTO; YAGINUMA; NIIMI, 2009; PAN et al., 2009; TOMITA; KIKUCHI, 2009); microinjeções em regiões específicas do organismo (BETTENCOURT; TERENIUS; FAYE, 2002; HIRAI et al., 2004; YOKOI et al., 2013); embebimento de células com solução contendo

dsRNA (CLEMENS et al., 2000; BECK; STRAND, 2005; MARCH; BENTLEY, 2007; SIVAKUMAR et al., 2007; SHAH; FÖRSTEMANN, 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; e pulverização de solução de dsRNA em lagartas (WANG et al., 2011).

A partir da demonstração que o RNAi poderia ser desencadeado em insetos pela ingestão de dsRNA, ficou evidenciado o potencial de seu uso em escala na agricultura. Baum et al. (2007) demonstraram o silenciamento gênico por RNAi por meio do desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas de milho expressando dsRNA do gene da *ATPase vacuolar* (*V-ATPase*). Foi constatado que as plantas transgênicas que expressavam o dsRNA *V-ATPase*, em relação as plantas não transformadas, apresentaram um menor dano causado por larvas de *Diabrotica virgifera virgifera*. Já Mao et al. (2007) desenvolveram plantas transgênicas de tabaco expressando dsRNA do gene alvo *citocromo monooxygenase P450* (*CYP6AE14*) da lagarta *Helicoverpa armigera*. A inibição da expressão de *CYP6AE14* por meio do mecanismo de silenciamento gênico via RNAi levou ao aumento da sensibilidade das lagartas ao gossipol, que é um composto de defesa natural produzido por plantas de algodão.

A confirmação do silenciamento gênico em insetos-pragas por meio da ingestão plantas transgênicas expressando dsRNAs, abriram possibilidades potenciais reais para o controle de pragas agrícolas (KOCH; KOGEL, 2014). Essa abordagem foi então demonstrada para pragas das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera (KATOCH et al., 2013), incluindo as espécies *Helicoverpa armigera* em algodão (MAO et al., 2007), *Diabrotica virgifera* em milho (BAUM et al., 2007), *Nilaparvata lugens* em arroz (ZHA et al., 2011), *Myzus persicae* em arroz e *Arabidopsis* (PITINO et al., 2011), *Sitobion avenae* em trigo (XU et al., 2014), *Tuta absoluta* em tomateiro (CAMARGO et al., 2016; BENTO et al., 2019), entre outras.

A entrega de dsRNA aos insetos pode ocorrer por outras diversas formas, incluindo pela produção *in vitro* de dsRNA e a sua adição em dieta artificial fornecida aos insetos (TURNER et al., 2006; BAUTISTA et al., 2009; YANG et al., 2010; UPADHYAY et al., 2011; ASOKAN et al., 2014; GALDEANO et al., 2017; KUNTE et al., 2020); a adição de bactérias expressando moléculas de dsRNA a dietas artificiais (TIAN et al., 2009; KUNTE et al., 2020); aplicação de dsRNA sintético nas plantas (HUNTER et al., 2012; LI et al., 2015; SAN MIGUEL; SCOTT, 2016), bem como a nanoencapsulação de dsRNA sintético e fornecimento aos insetos (ZHANG; ZHANG; ZHU, 2010; ZHANG et al., 2015b; KUNTE et al., 2020).

O uso de plantas geneticamente modificadas como método de entrega de dsRNA tem sido, no geral, a forma mais considerada para a aplicação dessa tecnologia em campo devido à sua

facilidade de utilização (CAGLIARI et al., 2019). A aprovação da primeira planta transgênica para controle de insetos-praga via RNAi ocorreu em 2017 para o milho híbrido SMARTSTAX PRO que expressa dsRNA do gene *Snf7* para controle de *Diabrotica virgifera virgifera*, desenvolvido pelas empresas Monsanto e Dow AgroSciences (HEAD et al., 2017). Porém, a aprovação de organismos geneticamente modificados (OGMs) pelos órgãos regulatórios de cada país constitui-se em um processo moroso e de alto custo (FLETCHER et al., 2020). Sendo assim, alternativas para a entrega de dsRNA por formas não-transformativas, ou seja, sem a utilização de organismos geneticamente modificados, têm ganhado destaque nesse cenário (CAGLIARI et al., 2019). Nesse sentido, o fornecimento de dsRNA sintético é uma alternativa de métodos não-transformativos potencial no controle de pragas via RNAi, pois seu uso se assemelha ao de um inseticida (HUNTER et al., 2012; YU et al., 2013; CAGLIARI et al., 2019). No entanto, apesar das vantagens que apresenta por se configurar uma técnica de baixo impacto ambiental e de alta especificidade, o desenvolvimento dessa técnica como um produto comercialmente viável apresenta algumas limitações como a entrega tópica de moléculas de dsRNA estáveis e a garantia da extensão da duração da capacidade protetiva dessas moléculas (FLETCHER et al., 2020). Particularmente, a entrega de moléculas de dsRNA sintéticas a insetos-praga ainda apresenta outros desafios a serem considerados, como o de superar barreiras de degradação no trato digestório desses insetos (NIU et al., 2018). Nesse sentido, uma nova estratégia denominada de BioClay, que utiliza nanopartículas como as nanofolhas de hidróxido duplo em camadas (*nanosheets layered double hydroxide nanosheets*) para promover a proteção de moléculas de dsRNA, demonstrou aumento da janela de proteção por dsRNA contra patógenos virais por até 20 dias (MITTER et al., 2017). Essa abordagem permitiu a proteção da molécula de dsRNA contra a atividade de nucleases e a detecção de moléculas de dsRNA foi observada em superfície foliar por até 30 dias após a pulverização (MITTER et al., 2017).

Seja qual for o método de entrega de dsRNA, o mesmo deve garantir a estabilidade da molécula dentro do organismo do inseto até que atinja a célula na qual o gene alvo do silenciamento está sendo expresso, principalmente em ordens de insetos que apresentam recalcitrância ao silenciamento gênico por RNAi, como Diptera e Lepidoptera (TIAN et al., 2009; TERENIUS et al., 2011; YANG; HAN, 2014b; SHI et al., 2016; ZHANG et al., 2017). Nesse sentido, métodos de entrega que proporcionem maior estabilidade à molécula de dsRNA são os mais indicados, e dentre esses, os métodos de entrega por ingestão que utilizam bactérias geneticamente modificadas expressando dsRNA, demonstram potencial para uso do silenciamento gênico em lepidópteros (TIAN et al., 2009; YANG; HAN, 2014b; SHI et al., 2016; BENTO et al., 2019). Lagartas de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com dieta artificial contendo bactérias *E. coli* HT115 (DE3), que expressavam dsRNA do gene *chitin synthase A* (*SeCHSA*), mostraram

alteração no desenvolvimento e mortalidade superior quando comparadas ao controle, bem como a redução da expressão do gene alvo *SeCHSA* (TIAN et al., 2009). A mortalidade de lagartas de *H. armigera* apresentou aumento de 27% quando alimentadas com bactérias *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA para silenciamento do gene *CYP6B6* do citocromo *P450* (ZHANG et al., 2013). Em trabalho de comparação de métodos de entrega de dsRNA para lagartas de *H. armigera*, Yang e Han (2014b) testaram os métodos de microinjeção, ingestão de dsRNA sintetizado *in vitro* (uma vez e com reoferta diária) e ingestão contínua de bactérias *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA. Dentre eles, foi demonstrado que o método mais eficiente foi a ingestão contínua de bactérias expressando dsRNA, com redução da taxa de pupação em 68,7% e aumento da mortalidade larval em 34,1%. Ainda foi verificado que o dsRNA foi degradado mais rapidamente no suco intestinal do que na hemolinfa das lagartas; porém quando as lagartas foram alimentadas com bactérias, as células bacterianas proporcionaram maior proteção ao dsRNA e retardaram a degradação no suco intestinal. Em ensaios com a lagarta *Mythimna separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) foi comprovado o aumento na mortalidade de lagartas que se alimentaram de dieta contendo bactérias *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA homólogos a dois genes de *chitinase* durante sete dias (GANBAATAR et al., 2017). Nesses ensaios, foi demonstrada a redução no peso das lagartas e na expressão dos dois genes quando alimentadas com bactérias expressando dsRNA, evidenciando a eficiência desse método de entrega.

A sensibilidade e a resposta bem-sucedida ao silenciamento gênico por RNAi é fator chave para a utilização dessa técnica como alternativa no controle de insetos-praga. Porém, é conhecido que a eficiência desse mecanismo varia entre as diversas ordens e espécies de insetos. Sobre a variação entre as ordens de insetos, a ordem Coleoptera apresenta de modo geral um alto grau de silenciamento gênico por dsRNA entregues tanto via injeção, quanto via ingestão (BAUM et al., 2007; ZHU et al., 2011; IVASHUTA et al., 2015). Já ordens como Diptera e Lepidoptera, são apontados como recalcitrantes ao silenciamento gênico via RNAi, embora ensaios bem sucedidos de RNAi em lepidópteros já tenham sido relatados (TIAN et al., 2009; TERENIUS et al., 2011; YANG; HAN, 2014b; CAMARGO et al., 2015, 2016; SHI et al., 2016; ZHANG et al., 2017; BENTO et al., 2019).

Apesar das diversas razões que contribuem para a variação observada na resposta do RNAi, acredita-se que as nucleases presentes no lúmen do intestino dos insetos desempenham papel importante nessa resposta, uma vez que podem ser responsáveis pela degradação de moléculas de dsRNA (PRENTICE et al., 2019). Em Lepidoptera, além do pH alcalino no intestino dos insetos, a ação de enzimas RNase III foram apontados como possíveis mecanismos de

degradação da molécula de dsRNA quando a mesma entra em contato com o aparelho digestório do inseto (LAMONTAGNE et al., 2001; TERENIUS et al., 2011; ZHANG et al., 2013, 2015a; WANG et al., 2016; XU et al., 2016). Recentemente, foi descrita a nuclease RNAi *efficiency-related nuclease* (REase), sendo proposta como o possível mecanismo associado à recalcitrância da ordem Lepidoptera. Foi demonstrado a existência de um gene específico dessa ordem, o gene *up56*, que codifica a nuclease REase, que está presente no intestino médio desses insetos, e que é capaz de digerir a molécula de dsRNA antes que seja processada pela enzima *Dicer*, afetando a eficiência do mecanismo de RNAi (GUAN et al., 2018a). Posteriormente, em busca da elucidação da função da nuclease recentemente descrita, foi realizado o *knockout* de um homólogo da REase em *Helicoverpa armigera* através do sistema CRISPR/Cas9. Assim, nos ensaios de fornecimento de dsRNA, foi observado uma maior estabilidade do dsRNA em insetos nocauteados em relação ao controle, embora não tenha sido observado aumento notável na eficiência do RNAi (GUAN et al., 2019). Apesar desse resultado, assim como descrito em *O. furnacalis* por Guan e colaboradores (2018a), a HaREase foi superregulada na presença de dsRNA (GUAN et al., 2019).

Em busca de entender o papel das dsRNases na eficiência da resposta ao RNAi, foram identificados no transcriptoma de *Spodoptera litura* seis genes que codificam para endonucleases específicas de DNA/RNA, sendo que três dessas endonucleases eram específicas do intestino médio, e tiveram sua expressão aumentada durante o estágio larval. Nos experimentos de fornecimento de RNAi, foi possível constatar que múltiplas dsRNases contribuíram para a baixa eficiência do RNAi observada (PENG et al., 2020). Após a identificação e caracterização de duas nucleases expressas exclusivamente no intestino de *Leptinotarsa decemlineata*, o besouro-da-batata, foi observado um aumento na estabilidade do dsRNA em adultos dessa espécie após a remoção da atividade dessas nucleases (SPIT et al., 2017). Uma estratégia similar foi utilizada em *Schistocerca gregaria*, o gafanhoto do deserto, após a observação de uma nuclease com atividade ainda maior no suco gástrico; porém não foi observado o aumento na resposta ao RNAi (SPIT et al., 2017). Em experimentos com RNAi para silenciar genes da espécie *Cylas puncticollis*, foi observado que a resposta ao silenciamento gênico apresentava resultados diferentes após o fornecimento de dsRNAs via injeção ou via alimentação oral, sendo uma menor eficiência observada quando fornecido via alimentação oral (PRENTICE et al., 2019). Assim, com o intuito de entender se essa diferença na eficiência ao silenciamento gênico era devido à endonucleases presentes no intestino do inseto, foram identificados possíveis candidatos à dsRNases no transcriptoma de *Cylas puncticollis*. Posteriormente, foi silenciada uma das duas endonucleases caracterizadas e específicas do tecido intestinal e, após o silenciamento, foi observado um aumento na eficiência do RNAi, demonstrando o papel importante dessas dsRNases na eficiência da técnica (PRENTICE et al., 2019). Sendo

assim, fica claro o papel negativo que as dsRNases desempenham no silenciamento gênico via RNAi, e a interferência na atividade dessas nucleases se apresentam como uma estratégia de grande potencial na busca de melhores resultados na utilização da técnica de RNAi no controle de insetos-praga (SPIT et al., 2017).

Dessa forma, esse trabalho buscou identificar genes codificadores de ribonucleases homólogas a REases no transcriptoma de *T. absoluta* e foi possível observar a presença de dois homólogos, aqui denominados de *TaREaseI* e *TaREaseII*, que possivelmente estariam relacionados à baixa mortalidade observada em ensaios de RNAi realizados anteriormente por Camargo et al. (2015, 2016) e Bento et al. (BENTO et al., 2019). Buscou-se a caracterização da expressão desses genes identificados em tratamento de exposição de *T. absoluta* a moléculas de dsRNA homólogas a regiões do gene codificador da proteína fluorescente GFP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Criação de *Tuta absoluta*

Os insetos utilizados foram provenientes de colônias de criação de *T. absoluta* que foram estabelecidas no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Prof. Dr. Antonio Figueira no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). Os insetos foram criados alimentados com plantas de tomateiro cultivar “Santa Cruz Kada” (BAJONERO; PARRA, 2017). As plantas de tomateiro cultivar “Santa Cruz Kada” utilizadas para a criação de *T. absoluta* foram cultivadas em vasos de plástico de 1,5 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 L⁻¹ de calcário no momento de transplântio. As plantas foram mantidas em casa de vegetação do Laboratório de Melhoramento de Plantas, 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.

Na criação, os tomateiros foram mantidos em gaiolas entomológicas de 62,5 x 62,5 x 70 cm em uma sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 tomateiro 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 tratados com solução de sulfato de cobre 1% por 1 min (PANIZZZI; PARRA, 2009), lavados em água deionizada, coletados em papel filtro 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 ou para dar continuidade na criação (Figura 3).

Figura 3. Detalhe da coleta e tratamento de ovos de *T. absoluta*. A - Ovos depositados na face adaxial do folíolo de tomateiro; B, C - Ovos depositados na face abaxial do folíolo de tomateiro; D - Tratamento dos ovos com solução de 1% sulfato de cobre; E - Coleta dos ovos em papel filtro; F - Placa de Petri contendo os ovos de *T. absoluta* coletados em papel filtro.

3.2. Identificação de genes de ribonucleases potencialmente responsáveis pela degradação de dsRNA em *T. absoluta*

Para a busca de genes de ribonucleases potencialmente responsáveis pela degradação de dsRNA, foi utilizado o transcriptoma de *T. absoluta* por RNAseq de seis bibliotecas (CAMARGO et al., 2015). A sequência utilizada para a busca foi a do gene *up56* que codifica a nuclease RNAi *efficiency-related nuclease* (REase), inicialmente descoberta por Guan et al. (2018a) em *Ostrinia furnacalis*. Essa nuclease, específica de lepidópteros, foi descrita como um possível mecanismo relacionado à recalcitrância dessa ordem de insetos ao silenciamento gênico por RNAi. Apresenta domínio PIN característico e pode ser encontrada em banco de dados anotadas como proteínas não caracterizadas (*uncharacterized protein*) ou como proteínas asteroides.

Sendo assim, foram utilizadas quatro estratégias: (i) busca em banco de dados Blast2GO por termos GO (*gene ontology*) de sequências gênicas anotadas como proteínas não caracterizadas ou como proteínas asteroides, sendo verificado para todas estas sequências a presença do domínio PIN característico, utilizando para esse fim o banco de dados InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/release_notes/); (ii) utilização de *primer* para amplificação da

sequência do gene *up56* de *Diatraea saccharalis* (dados do nosso grupo ainda não publicados) para amplificação em *T. absoluta*; (iii) utilização de *primer* degenerado desenhado a partir do alinhamento entre as sequências de nucleotídeos do gene *up56* das espécies descritas por Guan et al. (2018a) disponíveis no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), acrescido da sequência identificada de *Diatraea saccharalis* (dados do nosso grupo ainda não publicados); (iv) busca de sequências em transcriptoma de *T. absoluta* utilizando o programa BLAST versão 2.7.1+, via *prompt* de comando, utilizando como sequência *query* a sequência do gene *up56* de *O. furnacalis* (GUAN et al., 2018a).

Para o desenho do *primer* degenerado, foi realizado alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *up56* de *Ostrinia furnacalis*, *Pectinophora gossypiella*, *Amyelois transitella*, *Papilio polytes*, *Plutella xylostella* e *Diatraea saccharalis*. A partir desse alinhamento, a sequência consenso foi utilizada para o desenho dos *primers* (Tabela 1). Após o desenho dos *primers* degenerados, foi realizada reação de PCR nas seguintes condições: 1 µL de cDNA de *T. absoluta* na diluição de 1:10 (*mix* de cDNA descrito no item 3.6.1.), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer* degenerado, 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas) em tampão (NH₄)₂SO₄, em volume final de 25 µL, seguido de amplificação em termociclador nas condições térmicas de 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 45 s e 72°C por 40 s, finalizando à 72°C por 5 min. Posteriormente foi realizado um teste de gradiente de temperatura, utilizando as temperaturas de 40, 42, 44, 46, 48 e 50°C.

Tabela 1. Sequência consenso de *Tuta absoluta* oriunda do alinhamento de sequências de nucleotídeos do gene *up56* das espécies de lepidópteros *Ostrinia furnacalis*, *Pectinophora gossypiella*, *Amyelois transitella*, *Papilio polytes*, *Plutella xylostella* e *Diatraea saccharalis* que deu origem ao *primer* degenerado.

Sequência consenso	<i>Primer Foward</i> (5'- 3')	<i>Primer Reverse</i> (5'- 3')
<i>Tuta absoluta</i>	gtBgtSRtMgacggRcaRaaBtWctt	tcHaYgtYVHVWStWatMaHHggaca

3.3. Análises *in silico* dos transcritos identificados como possíveis candidatos à REase de *T. absoluta*

Os transcritos de *T. absoluta* identificados como possíveis candidatos à *TaREase* foram analisados para confirmação de identidade. O primeiro passo teve o objetivo de identificar o domínio PIN característico dessa família de proteínas. Para isso, as sequências gênicas dos transcritos identificados foram traduzidas em proteínas com o auxílio da ferramenta de tradução de proteínas do programa ExPASy *Bioinformatics Resource Portal* (<https://www.expasy.org/>; <https://web.expasy.org/translate/>). Posteriormente, as sequências de aminoácidos foram

analisadas no banco de dados InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/release_notes/), onde o domínio PIN característico seria identificado. No próximo passo, as sequências gênicas dos transcritos identificados foram alinhadas com as sequências do gene *up56* de *Ostrinia furnacalis*, além das outras sequências do gene *up56* de *Plutella xylostella*, *Papilio polytes*, *Amyelois transitella* e *Pectinophora gossypiella*, todas da ordem Lepidoptera (GUAN et al., 2018a). Os alinhamentos foram feitos com o auxílio dos programas MEGA X ou BioEdit 7, pelo algoritmo ClustalW. Os alinhamentos foram então importados novamente para o MEGA X onde foram construídas árvores filogenéticas utilizando o método *Neighbor-Joining* (NJ) com parâmetros padrões do programa, exceto pelo *bootstrap* igual a 1.000. Dessa mesma maneira, foi realizado também o alinhamento com 34 sequências de seis ordens de insetos (Lepidoptera, Hemiptera, Isoptera, Diptera, Coleoptera e Hymenoptera), oriundas de busca por similaridade de sequências realizada no NCBI, como apresentado por Guan et al. (2018a), e a construção de árvores filogenéticas para tais alinhamentos.

3.4. Escolha e desenho de *primers*

Foi escolhida a sequência que apresentou maior similaridade com a sequência do gene *up56* de *O. furnacalis* (GUAN et al., 2018a) e denominada de *TaREaseI*. A escolha das melhores regiões para o desenho de *primers* de dsRNA contou com o auxílio da ferramenta *SnapDragon – dsRNA Design* (https://www.flyrnai.org/cgi-bin/RNAi_find_primers.pl) para definir a melhor região para silenciamento. Com o intuito de se obter dois fragmentos distintos de dsRNA, a sequência gênica foi dividida em duas partes, uma amino-terminal, que apresentava a região com maior número de *sites* GGU, apontados como *sites* de preferência de processamento pela enzima *Dicer* em lepidópteros (GUAN et al., 2018b), e outra carboxi-terminal, que apresentava a região conservada do domínio PIN característico (GUAN et al., 2018a). Sendo assim, os *primers* foram desenhados para essas regiões específicas e foram denominados de dsGGU e dsPIN, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Sequências de *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos de dsRNA do gene *up56* de *Tuta absoluta*

Fragmento do gene <i>up56</i> de <i>Tuta absoluta</i> (<i>ta_transcript_91585</i>)	Sequência (5'- 3')	Amplicon (pb)
dsGGU	AACTGGGAATTCATTCGTCG TCGTGTGAGTTGGCTTTTG	526
dsPIN	AAAAACGCAGCCGTAGTTGT TTTGCAGAAAGGCATCCAAT	514

Posteriormente, foram desenhados *primers* para análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) dos dois transcritos identificados e aqui denominados de *TaREaseI* e *TaREaseII*. Apesar de os transcritos apresentarem diferentes graus de similaridade com a sequência do gene *up56* de *O. furnacalis* (GUAN et al., 2018a), os dois apresentam grande similaridade entre si. Sendo assim, foi tomado o cuidado de escolher regiões diferentes para o desenho dos *primers*, garantindo assim a especificidade da análise. Para o desenho dos *primers* foi utilizada a ferramenta *OligoPerfect Primer Designer*, da ThermoFisher Scientific (<https://apps.thermofisher.com/apps/oligoperfect/>). Os melhores pares de *primers* foram então escolhidos e analisados pela ferramenta Multiple Primer Analyzer, também da ThermoFisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>). As sequências dos *primers* são apresentadas na Tabela 3. O gene *elongation factor 1-alpha* (*EF1 alpha*) de *T. absoluta* foi utilizado como gene de referência para a análise de RT-qPCR (BENTO et al., 2019).

Tabela 3. Sequências de *primers* relativos aos transcritos *TaREaseI* e *TaREaseII* e ao gene de referência *EF1 alpha* utilizados para análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

Transcrito de <i>T. absoluta</i>	Sequência (5'- 3')	Amplicon (pb)
<i>TaREaseI</i> (ta_transcript_91585)	CCGGAATCCCAACGGAATAC GGCCCAACTGCCTTCAAATA	152
<i>TaREaseII</i> (ta_transcript_33040)	GCGATGAAGCTTGTGTTTGG AGCGAAATTGAGGTCAGACT	200
<i>EF1 alpha</i>	CCTGGGCACAGAGATTTCAT GTCCGTTCTTGAGATACCG	118

3.5. Ensaio de fornecimento de dsGFP para análise de expressão

3.5.1. Dieta artificial de *Tuta absoluta*

Nos experimentos de fornecimento de bactérias *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA foi utilizada a dieta artificial de *T. absoluta* desenvolvida por Bajonero e Parra (2017) (Tabela 4). Cerca de 4 mL de dieta foram dispostas em tubo de vidro (1 cm de diâmetro x 6 cm de altura) de fundo chato tampados com algodão hidrofóbico. Estes tubos foram previamente autoclavados

para evitar a contaminação por microorganismos e todo o processo foi realizado dentro de capela de fluxo laminar.

Tabela 4. Composição da dieta artificial de *Tuta absoluta* utilizada nos experimentos de alimentação de lagartas com bactéria *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA dos fragmentos de interesse (BAJONERO; PARRA, 2017).

Componentes	Quantidade
Germe de trigo	22,5 g
Celulose	3,7 g
Sacarose	26,2 g
Cloreto de colina	0,7 g
Sais de Wesson*	7,5 g
Caseína	26,2 g
Ácido ascórbico	3,0 g
Metilparahidroxilbenzoato (nipagin)	1,5 g
Tetraciclina	0,5 mg
Formaldeído 37%	1,0 mL
Solução vitamínica**	7,5 mL
Ágar	9,0 g
Água	630 mL

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

** carbonato de cálcio: 10,5 g 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.

3.5.2. Condições experimentais

Com o objetivo de avaliar o efeito na expressão dos genes *TaREaseI* e *TaREaseII* devido a presença de dsRNA de GFP, lagartas neonatas de *T. absoluta* foram expostas a alimentação em dieta artificial contendo *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA de GFP (*green fluorescence protein*, 869 pb – Addgene plasmid # 11335). Para isto, uma única colônia de HT115(DE3) transformada

com vetor de expressão de dsRNA (L4404) foi cultivada em meio LB contendo 100 mg mL⁻¹ de ampicilina e 12,5 mg mL⁻¹ de tetraciclina por 18 h a 37°C sob agitação a 130 rpm. Após este período, o meio de cultura foi diluído 100 vezes em 500 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 200 rpm a 37°C) até atingir OD_{600nm} = 0,4 (LISA TIMMONS; DONALD L. COURT; ANDREW FIRE, 2001; LI; ZHANG; ZHANG, 2011; ZHANG et al., 2013). Em seguida foi acrescentado IPTG (isopropil β-D-1-thiogalactopiranosideo) até uma concentração final de 0,4 mM 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 ressuspensionado em 2 mL de água milliQ autoclavada. O volume ressuspensionado foi corado com 1% de corante artificial alimentício de cor azul (Coralim, Mix, São Bernado do campo, Brasil) para melhor visualização do espalhamento da solução bacteriana sobre a dieta artificial. Aliquotas 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 após o tratamento com DNase I e RNase T1 (LISA TIMMONS; DONALD L. COURT; ANDREW FIRE, 2001; NWOKEOJI et al., 2017) por meio eletroforese de gel de 2% agarose em tampão TAE (40 mM de Tris, 20 mM de ácido acético glacial, 1 mM de EDTA pH8,0, pH ajustado para 8,3) corado com brometo de etídio (1 mg mL⁻¹) e fotodocumentado. Em seguida, foram aplicados 65 µL das suspensões bacterianas coradas 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. Após esse período, foram inoculadas 5 lagartas neonatas de *T. absoluta* por tubo (Figura 4). O experimento contou com 3 tratamentos: 1) sem nenhuma suspensão bacteriana adicionada; 2) suspensão bacteriana expressando o vetor de silenciamento vazio e 3) suspensão bacteriana expressando dsRNA do gene GFP. Para cada tratamento, foram coletadas amostras em 4 tempos diferentes: 1) 2 h após a inoculação das lagartas, 2) 4 h após a inoculação das lagartas, 3) 6 h após a inoculação das lagartas e 4) 8 h após a inoculação das lagartas. Para cada tratamento, em cada tempo de coleta, foram coletados 4 pools de lagartas, composto por 15 lagartas cada pool. Sendo assim, o experimento contou com 16 pools de lagartas por tratamento (4 pools por tempo de coleta), totalizando 48 pools ou amostras coletadas. Para tanto, foram inoculados 56 tubos de dieta por tratamento. Os experimentos foram mantidos em câmara climatizada a 25 ± 2°C, fotofase de 14 h e UR 60% (Figura 4).

Figura 4. A - 65 μ L das suspensões bacterianas coradas com corante azul sobre a dieta artificial de *T. absoluta*; B - Detalhe das lagartas inoculadas nos tubos de dieta; C - Câmara climatizada a 25 $\pm$ 2°C; D - Caixa entomológica utilizada para dispor os tubos de dieta inoculados na câmara climatizada.

3.5.3. Extração de RNA e síntese de cDNA das amostras de *T. absoluta*

Para a análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) deste ensaio, foi extraído o RNA total de cada uma das 48 amostras coletadas. A maceração das amostras foi realizada com o auxílio do homogeneizador de amostras *Bead Ruptor 24 Elite* (Omni International, Inc., Kennesaw, GA) e para a extração do RNA total das amostras, foi utilizado o kit de extração de RNA Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA, EUA) que utiliza amostra preparada em reagente TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) aplicada em uma coluna denominada Zymo-Spin™ Column, seguindo o protocolo do fabricante. O RNA total extraído das 48 amostras de *T. absoluta* foram quantificados em NanoDrop (Thermo Fischer Scientific; Waltham, MA, EUA) e sua integridade foi visualizada em gel TAE de 1% agarose corado com 1,5% (v/v) brometo de etídeo. Após a quantificação, cerca de 500 ng do RNA de cada amostra foi tratado empregando 1 U de DNase I (Life Technologies) em tampão apropriado, e água DEPC inativa, em reação incubada a 25°C por 15 min. A reação foi parada com a adição de 1 μ L de EDTA (25 mM) e incubada a 65°C por 10 min. Amostras de 1 μ g de RNA total tratado foram acrescidas

de 1 µL oligo (dT) (50mM) e 1 µL de dNTP (10 mM) e foram desnaturadas a 65°C por 5 min e incubadas a 4°C por 1 min, seguido da adição de 4 µL de 5X *First-Strand Buffer*, 1 µL de DTT (0,1 M), 40 U de RNaseOUT e 200 U da enzima SuperScript III RT (Life Technologies). A reação foi então incubada a 25°C por 15 min, seguida de incubação a 50°C por 1 h e 70°C por 15 min. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C.

Para a confirmação da qualidade do cDNA, foi realizada uma reação de PCR para cada uma das amostras extraídas, utilizando para tal o *primer EF1* (*primer* específico para o gene de referência escolhido para a análise de RT-qPCR) (Tabela 3). As reações de PCR continham 1 µL de cDNA na diluição de 1:10 de cada amostra, 1,5 mM MgCl₂, 500 µM de cada dNTP, 0,1 µM de cada *primer EF1* (Tabela 3), 0,8 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, Waltham, MA, EUA) em tampão (NH₄)₂SO₄, em volume final de 25 µL. A amplificação foi conduzida em termociclador, empregando as seguintes condições térmicas: 95°C por 2 min, seguindo de 30 ciclos de 95°C por 30 s, 62°C por 25 s e 72°C por 25 s, finalizando à 72°C por 5 min. Em seguida as amplificações foram analisadas por eletroforese em gel de 1,5% de agarose.

3.5.4. Análise de RT-qPCR

O efeito na expressão dos genes identificados (*TaREaseI* e *TaREaseII*) foi analisado pela quantificação da expressão dos genes alvos por meio de RT-qPCR. Após a realização das coletas de 2 h, 4 h, 6 h, e 8 h após a inoculação das lagartas, os *pools* de 15 lagartas foram coletados para análise da expressão gênica. Cada um dos tratamentos contou com 4 replicatas biológicas. Para a análise de expressão gênica, foi utilizado 5 µL de KAPA SYBR FAST (Kapa Biosystems, Cidade do Cabo, África do Sul), 0,2 µM de cada *primer* (Tabela 3), 1 µL do cDNA diluído 1:9 e água milli-Q autoclavada para um volume final de reação de 10 µL. Todas as reações continham um controle negativo (sem cDNA) e foram realizadas no RotorGene-6000 (Qiagen, Hilden, Alemanha). O perfil das reações foi designado 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 20 s, 60°C por 25 s e 72°C por 25 s. Após a amplificação, determinou-se a curva de dissociação entre 72 e 95°C. Os valores de C_Q foram utilizados para determinar a diferença da expressão gênica, de acordo com método “Delta Delta” (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). 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.

3.6. Silenciamento gênico de *TaREaseI* utilizando dsRNA produzido por *Escherichia coli* HT115 (DE3)

3.6.1. Extração de RNA de *T. absoluta* e síntese de cDNA

Para a amplificação e clonagem dos fragmentos dsGGU e dsPIN do gene *TaREaseI* que darão origem aos dsRNAs a serem utilizados em ensaios de silenciamento gênico, foram utilizados RNAs totais extraídos de amostras de lagartas de cada um dos quatro ínstares de *T. absoluta* que foram coletadas separadamente, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até a extração (fornecido por Flavia Manoel Bento Rodrigues) (BENTO et al., 2019). Posteriormente, amostras de 1 µg de RNA total tratado com DNase I foram acrescidas de 1 µL oligo (dT) (50mM) e 1 µL de dNTP (10 mM) e foram desnaturadas a 65°C por 5 min e incubadas a 4°C por 1 min, seguido da adição de 4 µL de 5X *First-Strand Buffer*, 1 µL de DTT (0,1 M), 40 U de RNaseOUT e 200 U da enzima SuperScript III RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A reação foi então incubada a 25°C por 15 min, seguida de incubação a 50°C por 1 h e 70°C por 15 min. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C. Posteriormente, com as amostras de cDNA de cada um dos ínstares, foi feito um *mix* de cDNA com partes iguais de cada ínstar. O cDNA foi diluído dez vezes para uso como solução de trabalho.

3.6.2. Clonagem dos fragmentos de dsRNA em vetor pGEM-T Easy

Os dois fragmentos (dsGGU e dsPIN) do gene *TaREaseI* foram amplificados a partir do *mix* de cDNA de ínstares de lagartas com o uso de pares de *primers* específicos (Tabela 2). As reações de amplificação continham 1 µL do *mix* de cDNA de lagartas de todos os ínstares não diluído, 4 µL de 5X *Platinum II PCR Buffer*, 400 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer* (Tabela 2), 0,04 U da *Platinum II Taq Hot- Start DNA Polymerase* (Invitrogen) num volume final de 20 µL. A amplificação foi conduzida em termociclador, empregando as seguintes condições térmicas: 94°C por 2 min, seguindo de 35 ciclos de 94°C por 15 s, 60°C por 15 s e 68°C por 15 s. Em seguida as amplificações foram analisadas por eletroforese em gel TAE de 1,5% de agarose. Os fragmentos de interesse foram recortados do gel com o auxílio de uma lâmina descartável estéril e purificados utilizando-se o kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare; Buckinghamshire, Reino Unido) de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, os fragmentos purificados foram clonados em vetor pGEM-T Easy (Promega Madison, WI, EUA). Para isso, cerca de 50 ng de DNA amplificado, purificado e quantificado em fluorômetro Hoefer DyNA Quant 200 (Hoefer Inc.; Holliston, MA, EUA) foram aliquotados em microtubo juntamente com tampão de ligação, 50 ng de vetor pGEM-T Easy e 3 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 Eletroporador 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 para seleção das bactérias das bactérias transformantes.

As bactérias positivas para transformação foram inoculadas em meio LB líquido contendo 100 mg L⁻¹ de ampicilina e a presença dos insertos foram confirmadas pela extração do DNA plasmidial por lise alcalina, seguida de análise por digestão com *EcoRI* por 4 h a 37°C. A presença dos insertos também foram confirmadas pela amplificação dos fragmentos via PCR empregando os *primers* T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG) juntamente com o *primer reverse* de dsGGU ou dsPIN (Tabela 2). Para confirmação da identidade dos fragmentos de interesse, os plasmídeos foram sequenciados por sequenciador 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems) do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/USP). As reações do sequenciamento continham oligo T7 ou SP6, e foram conduzidas sob as seguintes condições de reação: 95°C por 1 min, 35 ciclos de 95°C por 15 s, 50°C por 15 s e 60°C por 2 min. Foram sequenciados 6 clones de cada transformação.

3.6.3. Clonagem dos fragmentos de dsRNA em vetor de silenciamento em plasmídeo L4440

Com o objetivo de expressar fita dupla de RNA (dsRNA) dos fragmentos dsGGU e dsPIN do gene *TaREaseI* de *T. absoluta* em *E. coli* cepa HT115 (DE3), os fragmentos clonados no plasmídeo pGEM-T *Easy* 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. Assim, o vetor pGEM-T *Easy* contendo o fragmento denominado de dsPIN (Tabela 2) e o plasmídeo L4440 foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* por 16 h a 37°C. No caso do fragmento denominado de dsGGU (Tabela 2), o vetor pGEM-T *Easy* contendo o fragmento dsGGU e o plasmídeo L4440 foram digeridos com as enzimas de restrição *SacII* e *SpeI*, por 16 h a 37°C, para evitar a recircularização do vetor de destino, L4440. Após esse período, os produtos da digestão foram verificados em gel de 1,25 % agarose em tampão TAE corados com SYBR Gold, na presença de marcador molecular (100 bp). Os fragmentos de interesse apresentam

514 e 526 pb, respectivamente (Tabela 2), 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 o kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit*. Em seguida, os fragmentos foram quantificados em fluorômetro DyNA Quant 200. Após a quantificação, os fragmentos foram submetidos à reação de ligação com o plasmídeo L4440 utilizando a enzima de ligação T4 DNA ligase (Invitrogen). Em seguida, foi realizada a transformação por eletroporação em células competentes de *E. coli* (TOP10), seguida de plaqueamento em meio LB com antibiótico ampicilina (100 mg mL^{-1}) e mantidas a 37°C durante 16h. Após esse período, cada uma das colônias positivas foram repicadas em meio LB líquido com antibiótico ampicilina (100 mg mL^{-1}) e mantidas a 37°C por 16 h sob agitação de 130 rpm para extração de DNA plasmidial foi quantificado em fluorômetro DyNA Quant 200, e a presença do fragmento de interesse foi confirmada por digestão a 37°C por 16 h com *Sall* no caso do fragmento dsPIN (Tabela 2) e com *EcoRV* no caso do fragmento dsGGU (Tabela 2), posteriormente visualizadas em gel de 1,25% agarose em tampão TAE corados com SYBR Gold. As colônias positivas foram sequenciadas utilizando o sequenciador 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems) a fim de confirmar a identidade do fragmento de interesse, antes da transformação em *E. coli* HT115 (DE3).

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

Os plasmídeos L4440 contendo os fragmentos de interesse de *T. absoluta* confirmados por sequenciamento foram quantificados e então 200 ng adicionados a 40 μL da cultura eletrocompetente HT115 (DE3) e submetidos à eletroporação. 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 ($12,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Os clones foram repicados em meio LB líquido com os mesmos antibióticos a 37°C e mantidos por 16 h sob agitação de 130 rpm. Em seguida, foram realizadas extração do DNA plasmidial por lise alcalina, seguida de análise da digestão com *EcoRV* para o fragmento dsGGU (Tabela 2) e com *EcoRI* para o fragmento dsPIN (Tabela 2) por 16 h a 37°C seguida da análise de eletroforese em gel de 1,25% agarose em tampão TAE. Foram ainda escolhidas 3 colônias positivas de cada fragmento para posterior sequenciamento em sequenciador 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems) e as bactérias transformadas confirmadas foram estocadas a -80°C para serem utilizadas em experimentos. Para ser utilizado como controle negativo do experimento, também foi realizada a transformação de *E. coli* HT115 (DE3) utilizando minipreparação plasmidial de L4440 vazio.

3.6.5. Alimentação de lagartas de *T. absoluta* com dieta artificial contendo dsRNA do gene AK + dsRNA do gene *TaREaseI* expresso por *Escherichia coli* HT115 (DE3)

Com o objetivo de avaliar o efeito no silenciamento gênico em *T. absoluta* devido a presença de *E. coli* expressando dsRNA do gene alvo *Arginine Kinase* (AK), anteriormente desenvolvido por Bento e colaboradores (2019), e do gene *TaREaseI*, que codifica uma nuclease REase, apontada como possível mecanismo relacionado à recalcitrância de lepidópteros ao silenciamento gênico por RNAi (GUAN et al., 2018a), lagartas neonatas foram expostas a alimentação em dieta artificial específica contendo suspensão bacteriana de *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene AK acrescido de *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA da região do domínio PIN característico (dsPIN) do gene *TaREaseI*, solução bacteriana de *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA do gene AK apenas e também *E. coli* HT115 (DE3) transformada com o plasmídeo L4440 vazio. Para isso, foi utilizado o protocolo descrito no item 3.5.1, porém foram inoculadas 3 lagartas neonatas de *T. absoluta* por tubo de dieta (BAJONERO; PARRA, 2017). O experimento contou com 4 tratamentos: 1) sem nenhuma suspensão bacteriana adicionada; 2) suspensão bacteriana expressando o vetor de silenciamento pL4440 vazio; 3) suspensão bacteriana expressando dsRNA do gene AK de *T. absoluta* e 4) suspensão bacteriana expressando dsRNA do gene AK de *T. absoluta* acrescido de suspensão bacteriana expressando dsRNA do gene *TaREaseI* de *T. absoluta*. Para tanto, foram inoculados 70 tubos de dieta por tratamento. Os experimentos foram mantidos em câmara climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotofase de 14 h e UR 60%.

3.7. Avaliação da forma de inoculação de *T. absoluta* em dieta artificial

Com o objetivo de avaliar a melhor forma de inoculação das lagartas de *T. absoluta* em dieta artificial, lagartas neonatas foram inoculadas de 3 maneiras distintas. Anteriormente, foi demonstrado por Bajonero e Parra (2017) o melhor recipiente para a criação em dieta artificial de *T. absoluta*, além da consideração sobre a necessidade da criação de uma fina película de dieta nas paredes do recipiente, aumentando desta forma, a área disponível para a alimentação das lagartas e “simulando” a condição natural de alimentação dessas lagartas, no caso, lâminas foliares. Sendo assim foram analisadas 3 formas de inoculação: (i) a primeira constava da película indicada acima e a inoculação foi realizada nessa região; (ii) a segunda constava da película indicada acima e a inoculação foi realizada na região central da dieta artificial; (iii) a terceira não constava da película indicada acima e a inoculação foi realizada na lateral da dieta artificial. Em cada um dos tubos de

dieta foram inoculadas 3 lagartas neonatas, assim como descrito por Bajonero e Parra (2017) e para cada tratamento ou forma de inoculação, 10 tubos foram inoculados (Figura 5). Para cada tratamento, foram avaliados a mortalidade das larvas e a 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; HINDE; MORAL, 2014). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o uso do software estatístico R. Os experimentos foram mantidos em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotofase de 14 h e UR 60%.

Figura 5. Detalhe das formas de inoculação de lagartas neonatas de *T. absoluta* em dieta artificial. A – Inoculação de lagartas na região da fina película de dieta artificial na lateral do tubo; B – Inoculação de lagartas na região central da dieta artificial contendo fina película de dieta na lateral do tubo; C – Inoculação de lagartas na região lateral da dieta artificial sem a fina película de dieta artificial na lateral do tubo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para garantir a aplicabilidade da técnica de RNA de interferência como método de controle de insetos-praga, é necessário entender como esse mecanismo de silenciamento gênico se comporta nas diferentes espécies e ordens de insetos e quais são os fatores influenciadores na eficiência da resposta ao silenciamento gênico desencadeado pelo dsRNA. Neste contexto, acredita-se que as nucleases presentes no lúmen do intestino dos insetos desempenham papel importante na eficiência da técnica de RNAi e a recém descoberta RNAi *efficiency-related nuclease* (REase) foi apontada como possível mecanismo associado à recalcitrância da ordem Lepidoptera ao RNAi (GUAN et al., 2018a). Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo buscar em banco de dados de transcriptoma de *T. absoluta* (CAMARGO et al., 2015) genes de nucleases possivelmente associadas à degradação de moléculas de dsRNA em lepidópteros, como a REase, a fim de avaliar a sua relação com a eficiência da técnica de RNAi no controle de *T. absoluta*.

Em um trabalho anterior do nosso grupo, foi efetuada a montagem do transcriptoma de *T. absoluta* sequenciado a partir de RNAseq de seis bibliotecas (CAMARGO et al., 2015). Esses dados possibilitaram a investigação da presença da maquinaria principal de RNAi em *T. absoluta*, confirmando a sensibilidade desse inseto ao mecanismo de silenciamento gênico, além de tornar possível a predição de genes alvos. Em seguida, foram selecionados dois genes, o *Vacuolar ATPase-A* (*V-ATPase*) e o *Arginine kinase* (*AK*) e utilizando-se de duas abordagens para a entrega de dsRNA, a captação de dsRNA por folíolos de tomateiro e a técnica *in planta-induced transient gene silencing* (PITGS) para a expressão transiente de dsRNA em plantas, foram observadas taxas de mortalidade de *T. absoluta* em torno de 40% para ambos os genes alvos e taxa de silenciamento gênico em torno de 60%. Posteriormente, com o estabelecimento da dieta artificial de *T. absoluta* por Bajonero e Parra (2017), foi possível a entrega de dsRNA por meio de bactérias expressando moléculas de dsRNA adicionadas em dieta artificial (BENTO et al., 2019). Esse mecanismo de entrega de dsRNA possibilitou, além de maior proteção da molécula de dsRNA indicada para insetos da ordem Lepidoptera por sua reconhecida recalcitrância ao silenciamento gênico por RNAi, a realização de um *screening* para seleção dos melhores candidatos a genes alvos para o silenciamento (BENTO et al., 2019). Neste trabalho foi demonstrada mortalidade em torno de 46% para os genes alvos *JHP* (*juvenile hormone inducible protein*), *CHI* (*chitin synthase A*) e *COE* (*carboxylesterase*) e 72% para o gene *AK*.

As porcentagens relativamente baixas de mortalidades no geral observadas em trabalhos anteriores sugerem que *T. absoluta*, assim como outros insetos da ordem Lepidoptera, possam

apresentar mecanismos de degradação do dsRNA, embora significativas taxas de silenciamento tenham sido observadas. No primeiro estudo sobre a comparação da taxa de mortalidade e silenciamento gênico via RNAi entre espécies recalcitrante e sensível a essa técnica, foi observado que na espécie sensível, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), foram obtidas taxas de mortalidade de até 100% e taxas de silenciamento gênico permanentes maiores que 80%. Já no inseto recalcitrante, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae), a taxa de mortalidade observada foi em torno de 60% e as taxas de silenciamento gênico apresentaram níveis de até 40% de supressão transiente (CAO; GATEHOUSE; FITCHES, 2018). Sendo assim, a primeira etapa desse trabalho foi realizar a identificação de genes de ribonucleases potencialmente responsáveis pela degradação de dsRNA em *T. absoluta* como a REase descrita por Guan et al. (2018a), a fim de investigar sua relação com a eficiência do RNAi neste inseto-praga.

4.1. Identificação de genes de ribonucleases potencialmente responsáveis pela degradação de dsRNA em *T. absoluta*

A primeira estratégia utilizada foi a busca em banco de dados Blast2GO por termos GO (*gene ontology*) de sequências gênicas anotadas como proteínas não caracterizadas ou como proteínas asteroides, uma vez que, de acordo com Guan et al. (2018a), a sequência da nuclease REase pode ser encontrada anotada como tal neste banco de dados. Portanto, foi aplicado o filtro de proteínas asteróideis e de *uncharacterized protein* neste banco de dados. Para o primeiro caso, não foi verificada nenhuma sequência correspondente. Para o segundo caso, foram verificadas 119 contigs, dentro dos quais 54 contigs apresentaram sequências repetidas. Para todos os 65 contigs restantes, foi verificado a presença do domínio PIN característico. Entretanto, nenhuma das sequências em questão apresentou o domínio PIN, sendo necessária a utilização de uma outra estratégia para encontrar a sequência homóloga do gene *up56* de *Ostrinia furnacalis* em *Tuta absoluta*.

A segunda estratégia adotada foi a utilização de *primer* de amplificação da sequência do gene *up56* de *Diatraea saccharalis* (Bruna Factor, comunicação pessoal) para amplificação em *T. absoluta*. Para essa reação, foram utilizadas as mesmas condições da reação de amplificação em *D. saccharalis*. Neste caso, não houve amplificação no cDNA de *T. absoluta* com o *primer* do gene *up56* de *D. saccharalis*, porém houve amplificação correta da combinação do cDNA de *D. saccharalis* com o *primer* do gene *up56* e da combinação do cDNA de *T. absoluta* com o *primer chitin synthase A* (CHI), além disso não houve amplificação na combinação de cDNA de *D. saccharalis* com o *primer chitin synthase A* (CHI) de *T. absoluta*, confirmando assim o resultado negativo da reação. Esse resultado negativo para essa reação corrobora com os dados demonstrados por Guan et al. (2018a) onde a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos referentes à REase das espécies *O. furnacalis*,

P. xylostella, *P. polytes*, *P. gossypiella*, *H. armígera*, *A. ypsilon* e *A. transitella* foi constatado que, salvo três aminoácidos extremamente conservados na região do domínio PIN característico, há certa diversidade entre as sequências das espécies. Sendo assim, houve a necessidade de adotar uma outra estratégia para encontrar a sequência homóloga do gene *up56* em *T. absoluta*.

Assim, considerando a similaridade observada entre as sequências de aminoácidos da região conservada do domínio PIN das REases, a terceira estratégia se deu pela utilização de *primer* degenerado desenhado a partir do alinhamento entre as sequências do gene *up56* das espécies descritas por Guan et al. (2018a) disponíveis no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), acrescido da sequência identificada de *D. saccharalis* para a amplificação do gene homólogo de *up56* em *T. absoluta* (Figura 6). Essa estratégia de utilização de *primer* degenerado já foi utilizada anteriormente com sucesso em casos em que não havia a disponibilidade de transcriptoma sequenciado da espécie em questão ou em casos em que pouca informação genética sobre a espécie estava disponível (XU; HAN, 2008; CAMARGO et al., 2016). Sendo assim, após o desenho dos *primers* degenerados, foi realizada reação de PCR para a amplificação da REase de *T. absoluta*. A reação não obteve sucesso na amplificação. Posteriormente, foi realizado um teste de gradiente de temperatura para amplificação da sequência, utilizando as temperaturas de 40, 42, 44, 46, 48 e 50°C, mas também não foi obtido sucesso na amplificação, sendo necessária a utilização de uma nova abordagem para encontrar a sequência homóloga do gene *up56* em *Tuta absoluta*.

Figura 6. Alinhamento da sequência de nucleotídeos da REase das espécies *Ostrinia furnacalis*, *Pectinophora gossypiella*, *Plutella xylostella*, *Amyelois transitella*, e *Papilio polytes* (Lepidoptera). Linhas vermelha e verde representam as regiões escolhidas para desenho dos *primers* degenerados Forward e Reverse, respectivamente.

Por fim, foi realizada a busca de sequências no transcriptoma de *T. absoluta* utilizando o programa BLAST versão 2.7.1+, via *prompt* de comando, utilizando como sequência *query* a sequência do gene *up56* de *Ostrinia furnacalis* (CAMARGO et al., 2015; GUAN et al., 2018a). Para isso, foram utilizados dois *scripts*. O primeiro *script* foi utilizado para a formatação do banco de dados, no caso o transcriptoma de *T. absoluta*, utilizando a ferramenta “makeblastdb”. Posteriormente, com o banco de dados formatado e pronto para receber a busca de sequências, foi utilizado um *script* para realizar a busca em questão. Algumas tentativas foram realizadas com o comando “blastn”, modificando argumentos como “e-value” e “task”, porém não foram obtidos resultados. Foi rodado novamente uma busca, porém com o comando “tblastx”, utilizando os mesmos parâmetros e, dessa vez, foram encontrados 5 contigs potenciais para a REase de *T. absoluta*. O contig 91585 apresentou 15 regiões de alinhamento com 87% de cobertura, sendo, portanto, o transcrito que apresentou maior similaridade com a sequência *query* do gene *up56* de *O. furnacalis*. Na sequência, o contig 33040 apresentou 7 regiões de alinhamento com 44% de cobertura e o contig 19071 apresentou 5 regiões de alinhamento com 28% de cobertura. Os contigs 18152 e 9492 apresentaram somente uma região de alinhamento com 4 e 5% de cobertura, respectivamente.

4.2. Análises *in silico* dos transcritos identificados como possíveis candidatos à REase de

T. absoluta

Os transcritos identificados como possíveis candidatos à *TaREase* foram então analisados para a identificação do domínio PIN característico. Dentre os 5 contigs identificados, somente os contigs 91585, 33040 e 19071 apresentaram o domínio PIN no terminal amino e foram caracterizados como sendo da família de proteínas asteroides. As sequências de nucleotídeos preditas de cada contig apresentaram 1755, 1743 e 2202 pb, respectivamente.

Em seguida, as sequências preditas de aminoácidos dos transcritos foram alinhadas com as sequências de aminoácidos do gene *up56* de *Ostrinia furnacalis*, *Plutella xylostella*, *Papilio polytes*, *Amyelois transitella* e *Pectinophora gossypiella*, todos da ordem Lepidoptera. No alinhamento múltiplo, foi possível verificar um maior grau de similaridade do contig 91585, confirmando o resultado observado na busca de sequências utilizando o programa BLAST (Figura 7). A sequência predita de aminoácidos do contig 91585 foi alinhada com as sequências de aminoácidos do gene *up56* de *O. furnacalis*, *P. xylostella* e *A. transitella* (Figura 7). Nesse alinhamento também foram indicados o domínio PIN característico no terminal amino da REase, além dos resíduos de aminoácidos conservados entre as sequências (GUAN et al., 2018a).

Posteriormente, foram utilizadas sequências de diversas espécies de lepidópteros para a construção de árvores filogenéticas (Figura 8). Foram também construídas árvores filogenéticas contendo 34 genes de 32 espécies pertencentes a 6 ordens de insetos (Lepidoptera, Hemiptera, Isoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera), com o intuito de assegurar a correta identificação das 3 sequências dos contigs 91585, 33040 e 19071 de *T. absoluta*, uma vez que as sequências das REases apresentam alto grau de similaridade com proteínas não caracterizadas e com homólogos de proteínas asteroides (Figura 9 e 10). Nesse caso, foi possível identificar que a sequência do contig 19071 não agrupou com as demais REases e sim com as outras sequências denominadas de proteínas asteroides e que os contigs 91585 e 33040 agruparam corretamente no braço das REases (GUAN et al., 2018a). Sobre a REase, proteína apontada como possível mecanismo associado à recalcitrância da ordem Lepidoptera ao silenciamento gênico via RNAi, foi observado que a mesma teve sua expressão aumentada em *O. furnacalis* e *H. armigera* após a exposição desses insetos a moléculas de dsRNA. Entretanto, esse aumento na expressão não foi observado para os genes codificadores de proteínas asteroides, agrupados fora do braço das REases, em *O. furnacalis*, *H. armigera* e *Tribolium castaneum*, o que levou à conclusão de que essas proteínas asteroides, embora apresentem sequências gênicas similares à REase, a função desses dois tipos de proteínas devem ser diferentes (GUAN et al., 2018a).

Portanto, com a análise *in silico* desses transcritos foi possível concluir que somente os contigs 91585 e 33040 são homólogos do gene *up56* de *O. furnacalis* e que o contig 19071, que havia apresentado a menor similaridade de sequência com a sequência original da REase de *O. furnacalis*, apesar de apresentar o domínio PIN característico, não pertence à nova classe de proteínas não caracterizadas denominadas de REase, mas sim à classe de proteínas asteroides (GUAN et al., 2018a). Deste modo, os contigs 91585 e 33040 foram aqui denominados de *TaREaseI* e *TaREaseII*.

Nesse aspecto é importante salientar que, interessantemente, foram encontradas duas proteínas REases potencialmente responsáveis pela degradação de moléculas de dsRNA em *T. absoluta*. Essa presença de mais de um membro da família REase de proteínas em uma mesma espécie de lepidóptero não havia sido relatada até então em nenhuma das espécies em que a presença da REase foi demonstrada (*O. furnacalis*, *H. armigera*, *A. transitella*, *P. gossypiella*, *A. ypsilon*, *P. polytes* e *P. xylostella*) (GUAN et al., 2018a, 2019). Porém, a identificação de múltiplas dsRNases atuando junto na degradação de moléculas de dsRNA em um inseto recalcitrante ao RNAi já foi demonstrada anteriormente (PENG et al., 2020). As dsRNases são assim denominadas pela sua atividade de degradação de moléculas de dsRNA, se relacionando com a eficiência da técnica de RNAi, assim como a REase (LUO et al., 2017; SPIT et al., 2017; GUAN et al., 2018a, 2019; PRENTICE et al., 2019). Em um estudo com o objetivo de avaliar a contribuição de mais de uma dsRNase na redução da eficiência do silenciamento gênico por RNAi em *Spodoptera litura*, foram encontrados seis genes que codificam endonucleases não específicas de DNA/RNA (DNA/RNA *non-specific endonuclease*) em que três eram especificamente expressas no intestino médio da fase larval desse inseto (PENG et al., 2020). Nesse caso, foi demonstrada a atividade de dsRNase para 4 das 5 proteínas testadas, onde a maior atividade de degradação foi observada no terceiro ínstar de lagartas de *S. litura*. Os dados sugerem que a ação conjunta de múltiplas dsRNases pode atuar na recalcitrância de lepidópteros ao RNAi. Desse modo, se mostra de grande importância a investigação da ação conjunta das REases de *T. absoluta* na eficiência do RNAi, bem como a investigação futura da presença de mais dsRNases no transcriptoma de *T. absoluta* que possam estar relacionadas à recalcitrância dessa ordem de insetos ao silenciamento gênico desencadeado pela molécula de dsRNA.

Figura 7. Alinhamento da sequência de aminoácidos do contig 91585 de *T. absoluta* com as sequências de aminoácidos do gene *up56* de *Ostrinia furnacalis* (REase), *Plutella xylostella* e *Amyelois transitella*. O sublinhado verde representa o domínio PIN característico no terminal amino da REase. Os 3 asteriscos vermelhos mostram resíduos de aminoácidos estritamente conservados.

Figura 8. Árvores filogenéticas construídas utilizando as sequências de aminoácidos do gene *up56* de *Ostrinia furnacalis* (REase), *Plutella xylostella*, *Papilio polytes*, *Pectinophora gossypiella* e *Amyelois transitella*, além da sequência de aminoácidos do contig 91585 (A), ou dos contigs 91585, 33040 e 19071 de *T. absoluta* (B). O método utilizado foi o *Neighbor-Joining* (NJ) com *bootstrap* de 1000.

Figura 9. Árvore filogenética construída utilizando a sequência de aminoácidos de 35 genes de 32 espécies pertencentes a 6 diferentes ordens de insetos (Lepidoptera, Hemiptera, Isoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenopteran) acrescido da sequência do contig 91585 de *T. absoluta*. As REases foram agrupadas em um braço com outras 5 proteínas não caracterizadas (*uncharacterized proteins*), indicados pelo traço vermelho. A árvore filogenética foi construída pelo método *Neighbor-Joining* (NJ) com *bootstrap* de 1000.

Figura 10. Árvore filogenética construída utilizando a sequência de aminoácidos de 37 genes de 32 espécies pertencentes a 6 ordens de insetos (Lepidoptera, Hemiptera, Isoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera) acrescido da sequência dos contigs 91585, 33040 e 19071 de *T. absoluta*. As REases foram agrupadas em um braço com outras 5 proteínas não caracterizadas (*uncharacterized proteins*), indicados pelo traço vermelho e os transcritos 91585, 33040 e 19071 foram destacados com caixa vermelha. A árvore filogenética foi construída pelo método *Neighbor-Joining* (NJ) com *bootstrap* de 1000.

4.3. Ensaio de fornecimento de dsGFP para análise de RT-qPCR

O gene *up56* foi originalmente identificado como induzido devido a exposição de *Ostrinia furnacalis* ao dsRNA da *enhanced green fluorescent protein*, dsEGFP. A indução pela exposição de *O. furnacalis* ao dsEGFP logo nas primeiras horas após o fornecimento permitiu a identificação e caracterização da REase (GUAN et al., 2018a). Sendo assim, com o objetivo de avaliar o efeito da exposição de lagartas de *T. absoluta* ao dsRNA na expressão dos transcritos identificados e denominados de *TaREaseI* e *TaREaseII*, foi conduzido ensaio em que lagartas neonatas de *T.*

absoluta foram expostas a alimentação em dieta artificial contendo solução bacteriana de *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA de GFP (dsGFP), contando com dois controles sendo a dieta sem a adição de solução bacteriana e a solução bacteriana de HT115 (DE3) contendo o vetor de silenciamento L4440 vazio.

Na apresentação dos resultados, os tratamentos foram denominados de “dieta” representando dieta artificial sem nenhuma suspensão bacteriana adicionada; “L4440” representando dieta artificial contendo suspensão bacteriana com o vetor de silenciamento L4440 vazio e “dsGFP” representando dieta artificial com suspensão bacteriana expressando dsRNA de GFP. Posteriormente à inoculação das lagartas neonatas de *T. absoluta* aos tratamentos, as amostras foram coletadas 2, 4, 6 e 8 horas após inoculação. Foram conduzidas quatro réplicas biológicas, as quais foram compostas por um *pool* de 15 lagartas, e duas réplicas técnicas para o RT-qPCR. Como gene de referência foi utilizado gene *elongation factor 1-alpha (EF1)* e o tratamento “dieta 2h” foi utilizado como normalizador para a análise de expressão relativa.

Na análise da expressão de ambos os transcritos identificados, *TaREaseI* e *TaREaseII*, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figuras 11 e 12). Porém, foi possível observar um padrão na expressão do transcrito *TaREaseI* ao longo dos tempos de coleta (2, 4, 6 e 8h) com a menor expressão relativa verificada para o tratamento “dieta” em todos os tempos de coleta, conforme o esperado (Figura 11 A). Em seguida, com uma expressão gênica relativa intermediária, aparece o tratamento “L4440” e, apresentando a maior expressão gênica relativa, o tratamento “dsGFP”. A expressão gênica relativa intermediária de *TaREaseI* no tratamento “L4440” foi um resultado inesperado, uma vez que esse compunha um tratamento controle do ensaio, com resultado esperado sendo semelhante ao do tratamento “dieta”. Devido a REase ser uma proteína que foi relacionada com o sistema imune do inseto, a entrega de bactérias geneticamente modificadas poderia desencadear respostas relacionadas ao sistema de defesa de *T. absoluta*, hipótese não levantada no estabelecimento da entrega de dsRNA via bactérias geneticamente modificadas (TIAN et al., 2009; YANG; HAN, 2014b; ABRIEUX; CHIU, 2016; AATHMANATHAN et al., 2018; GUAN et al., 2019).

Quanto a expressão gênica relativa do transcrito *TaREaseI* de cada tratamento ao longo dos tempos de coleta, foi possível observar que para todos os tratamentos a expressão gênica relativa desse transcrito diminuiu até o tempo de 6 horas após a inoculação, e tornou a aumentar no tempo de 8 horas (Figura 11 B). Esse resultado é consistente com as observações de aumento na expressão da REase de *O. furnacalis* 4 horas após a ingestão de moléculas de dsEGFP (GUAN et al., 2018a).

No caso do transcrito *TaREaseII* a obtenção dos resultados só foi possível após o aumento da concentração de cDNA na reação de RT-qPCR devido à sua menor expressão relativa em relação a *TaREaseI*, porém ainda assim não foi possível observar esse padrão (Figura 12).

Figura 11. Expressão gênica relativa de *TaREaseI* em lagartas ($n=4$) de *Tuta absoluta* após se alimentarem por 2, 4, 6 e 8 h em dieta artificial contendo suspensão de *E. coli* HT115(DE3) expressando dsRNA do gene GFP e seus respectivos controles. Como gene de referência foi utilizado o gene *elongation factor 1-alpha*. O tratamento “dieta 2 h” foi utilizado como normalizador para a expressão relativa. A letra A mostra a expressão gênica relativa dos tratamentos ao longo dos tempos de coleta e a letra B mostra a expressão relativa de cada tratamento ao longo do tempo. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). As médias não diferiram pelo teste de Tuckey ($p<0,05$).

Figura 12. Expressão gênica relativa de *TaREaseII* de lagartas ($n=4$) de *Tuta absoluta* após se alimentarem por 2, 4, 6 e 8 horas em dieta artificial com *Escherichia coli* HT115(DE3) expressando dsRNA do gene GFP. Como referência foi utilizado o gene *elongation factor 1-alpha*. O tratamento “dieta” foi utilizado como referência para a expressão relativa. Barras nas colunas indicam o erro padrão da média (EPM). As médias não diferiram pelo teste de F ($p<0,05$).

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

4.4.1. Amplificação e clonagem dos fragmentos de dsRNA em vetor pGEM-T *Easy*

Com o objetivo de utilização de bactérias *E. coli* HT115(DE3) expressando dsRNA complementar ao gene *TaREaseI* de *T. absoluta* que seriam entregues via dieta artificial, foram amplificados dois fragmentos distintos do gene *TaREaseI*. Um fragmento foi proveniente da região amino-terminal, que apresentava a região com maior número de *sites* GGU, apontados como *sites* de preferência de processamento pela enzima *Dicer* em lepidópteros (GUAN et al., 2018b). O outro fragmento foi proveniente da região carboxi-terminal, que apresentava a região conservada do domínio PIN característico, o que poderia levar ao silenciamento duplo das duas REases de *T. absoluta*, *TaREaseI* e *TaREaseII*, aumentando assim a eficiência do silenciamento gênico (GUAN et al., 2018a).

Os fragmentos foram amplificados e em seguida analisados por gel eletroforese (Figura 13) e recortados para posterior purificação dos fragmentos. Em seguida, os fragmentos purificados foram clonados em vetor pGEM-T *Easy*, e introduzidos em *E. coli* TOP10. As bactérias positivas para a transformação foram confirmadas por PCR seguida de sequenciamento. Foram sequenciadas 6 colônias do fragmento da região conservada do domínio PIN do gene *TaREaseI*, todas positivas, sendo escolhida a colônia que apresentou alinhamento perfeito com a sequência original do transcrito (Figura 14 A). Para a região com maior número de *sites* GGU, foram sequenciadas 4 colônias, sendo escolhida a colônia 4 por apresentar maior similaridade com a sequência original do transcrito (Figura 14 B).

Figura 13. Géis de 1,5% agarose indicando a amplificação da região conservada do domínio PIN característico do gene *TaREaseI* de *T. absoluta* (dsPIN); seguido do branco da reação B – Produto de amplificação da região com maior número de *sites* GGU do gene *TaREaseI* de *T. absoluta* (dsGGU); seguido do branco da reação.

Sequence ID: Query_22743 Length: 1176 Number of Matches: 1					Sequence ID: Query_85897 Length: 526 Number of Matches: 1				
Range 1: 72 to 585 Graphics					Range 1: 3 to 526 Graphics				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
950 bits(514)	0.0	514/514(100%)	0/514(0%)	Plus/Minus	965 bits(522)	0.0	523/524(99%)	0/524(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAAAACGACGCGTAGTTGTGGATGCTCAAACTCTCTACACCTGTATCAAGAAAGT	60			Query 48	CTGGGAATTCATTCTGCTGTAAGAAATCCCGGAATCCCAACGGAATCTTAGAAAATGG	107		
Sbjct 585	AAAAACGACGCGTAGTTGTGGATGCTCAAACTCTCTACACCTGTATCAAGAAAGT	526			Sbjct 3	CTGGGAATTCATTCTGCTGTAAGAAATCCCGGAATCCCAACGGAATCTTAGAAAATGG	62		
Query 61	GGTTATCTATACGCTTTGGGTTGAGAGCGCAAGATATGACAGATATTTGAGGAGTTAC	120			Query 108	TGGCAAAATTGACATTATTGACAAAGATCCGTTTGGTTCCAAAAGGTTGTCATCCAA	167		
Sbjct 525	GGTTATCTATACGCTTTGGGTTGAGAGCGCAAGATATGACAGATATTTGAGGAGTTAC	466			Sbjct 63	TGGCAAAATTGACATTATTGACAAAGATCCGTTTGGTTCCAAAAGGTTGTCATCCAA	122		
Query 121	CTTAGCATGTTCAAGAAAGCCCAACATCAATGCTATTTATTTTCAAGGAGGACATAAA	180			Query 168	GCACATTCCTTTGCAACTGATTAACTAGCTCGGTTTGACGTATTTGAAGGAGTTGGGC	227		
Sbjct 465	CTTAGCATGTTCAAGAAAGCCCAACATCAATGCTATTTATTTTCAAGGAGGACATAAA	406			Sbjct 123	GCACATTCCTTTGCAACTGATTAACTAGCTCGGTTTGACGTATTTGAAGGAGTTGGGC	182		
Query 181	GAATACATGAAGAGCTCAAAATATTGACGATTTATGATGATATCATAATTACAACATC	240			Query 228	CATAGCAGACTACACTCAAGATGATCTTAGAATGATTTGCCCTTGACATTATAAATATAC	287		
Sbjct 405	GAATACATGAAGAGCTCAAAATATTGACGATTTATGATGATATCATAATTACAACATC	346			Sbjct 183	CATAGCAGACTACACTCAAGATGATCTTAGAATGATTTGCCCTTGACATTATAAATATAC	242		
Query 241	AATGAAGAAATCAAGAGATATGCTTCTCCGATCTTCGAAAGATGTTTACAAGCAAAAT	300			Query 288	ATACAACTTGTCTACAACTTCGAGAAAGACGAACCTACTCTATACATTAAAAATAAAT	347		
Sbjct 345	AATGAAGAAATCAAGAGATATGCTTCTCCGATCTTCGAAAGATGTTTACAAGCAAAAT	286			Sbjct 243	ATACAACTTGTCTACAACTTCGAGAAAGACGAACCTACTCTATACATTAAAAATAAAT	302		
Query 301	TTGGATGAATGGGATTTGATTATACGATTTGCGAGATGAAGCTAAAAGGGAGCTGCATT	360			Query 348	ATATCCCGTGTGCTGAGAGAATCGATCTGAAAGCATCTATGACGAATCAACAGTCC	407		
Sbjct 285	TTGGATGAATGGGATTTGATTATACGATTTGCGAGATGAAGCTAAAAGGGAGCTGCATT	226			Sbjct 303	ATATCCCGTGTGCTGAGAGAATCGATCTGAAAGCATCTATGACGAATCAACAGTCC	362		
Query 361	GCACCTTGCAGGAAACTCAATGCCAGTGTGACAGTACGACATTTGAGTTCTGCTTCTCA	420			Query 408	TTTCGAAATGGCTGGAAAACTTGAAGAGCGAATCTTCAAGCACTTCTTGGACGAGCT	467		
Sbjct 225	GCACCTTGCAGGAAACTCAATGCCAGTGTGACAGTACGACATTTGAGTTCTGCTTCTCA	166			Sbjct 363	TTTCGAAATGGCTGGAAAACTTGAAGAGCGAATCTTCAAGCACTTCTTGGACGAGCT	422		
Query 421	GGACTTTCATACATCATGCACTGACCTCGAATTTGATGAACGAAGCAACAGTATAAAA	480			Query 468	TTTCCAAAGGTTGCACTTCGAAATGATACAGAAATTTGCCGGAAGATTTAAGGATGATCAT	527		
Sbjct 165	GGACTTTCATACATCATGCACTGACCTCGAATTTGATGAACGAAGCAACAGTATAAAA	106			Sbjct 423	TTTCCAAAGGTTGCACTTCGAAATGATACAGAAATTTGCCGGAAGATTTAAGGATGATCAT	482		
Query 481	TGTGGAAATTTTTCATTGGATGCTTTCTGCAAA 514				Query 528	GATCGCTCTAATATACTTCTCAGTCAAAAAGCCCACTCACAGA 571			
Sbjct 105	TGTGGAAATTTTTCATTGGATGCTTTCTGCAAA 72				Sbjct 483	GATCGCTCTAATATACTTCTCAGTCAAAAAGCCCACTCACAGA 526			

Figura 14. A – Detalhe do alinhamento da sequência da região conservada do gene *TaREaseI* de *T. absoluta* com a sequência oriunda do sequenciamento da colônia que apresentou alinhamento perfeito com a sequência original do contig; B – Detalhe do alinhamento da sequência da região com maior número de *sites* GGU do gene *TaREaseI* de *T. absoluta* com a sequência oriunda do sequenciamento da colônia que apresentou maior similaridade com a sequência original do contig. Ambos os alinhamentos foram gerados utilizando a ferramenta “blastx” do NCBI.

4.4.2. Clonagem dos fragmentos de dsRNA em vetor de silenciamento em plasmídeo L4440

Com o objetivo de expressar fita dupla de RNA (dsRNA) dos fragmentos de interesse (dsGGU e dsPIN) em *E. coli* cepa HT115 (DE3), os fragmentos clonados no plasmídeo pGEM-T

Easy foram subclonados no plasmídeo de silenciamento L4440. Após a transformação de bactérias *E. coli* (TOP10) com os vetores de entrada pGEM-T *Easy* ligados aos fragmentos dsGGU e dsPIN, foi realizado um *screening* com as bactérias positivas seguido de reação de digestão com enzimas de restrição e confirmadas por meio de gel eletroforese. No caso do fragmento dsPIN, como a digestão com enzima de restrição foi realizada com um tipo de enzima (*EcoRI*) a recircularização foi presente em diversas colônias, sendo necessário um *screening* com maior número de colônias para a identificação de colônias positivas. No caso do fragmento dsGGU, anteriormente à utilização de enzimas de restrição diferentes foram realizadas tentativas utilizando uma enzima de restrição somente (*EcoRI*), porém não foi possível identificar colônias positivas. Sendo assim, como alternativa foram utilizadas duas enzimas de restrição (*SacII* e *SpeI*), o que impediu a recircularização do vetor e assim o *screening* de todas as colônias foram positivas. As colônias positivas para ambos os fragmentos foram sequenciadas e confirmadas.

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

E. coli HT115 (DE3) foram transformadas com as minipreparações plasmidiais anteriormente confirmadas dos fragmentos dsGGU e dsPIN inseridas no vetor de silenciamento L4440. As colônias positivas passaram por um novo *screening*, seguido da digestão com as enzimas de restrição pertinentes para cada fragmento. Todas as colônias de ambos os fragmentos foram confirmadas pela digestão. Posteriormente, foram escolhidas 3 colônias de cada fragmento, e as mesmas foram sequenciadas. Após a confirmação das colônias via sequenciamento, as mesmas estavam prontas para serem utilizadas no ensaio de silenciamento gênico.

4.4.4. Alimentação de lagartas de *T. absoluta* com dieta artificial contendo dsRNA do gene AK + dsRNA do *up56* expresso por *Escherichia coli* HT115 (DE3)

Com o objetivo de avaliar o efeito no silenciamento gênico em *T. absoluta* devido a presença de *E. coli* expressando dsRNA do gene que apresentou maior taxa de mortalidade no *screening* de genes alvos de Bento et al. (2019), o gene *Arginine Kinase* (*AK*), conjuntamente do gene *TaREaseI*, homólogo da REase de *O. furnacalis*, apontada como possível mecanismo relacionado à recalcitrância de lepidópteros ao silenciamento gênico por RNAi por Guan et al. (2018a), lagartas neonatas de *T. absoluta* foram expostas a alimentação em dieta artificial acrescida de solução bacteriana de HT115 (DE3) expressando dsRNA de *AK* e *TaREaseI*. Essa abordagem foi

anteriormente utilizada com sucesso por Guan et al (2018a), e o tratamento duplo de RNAi pelo fornecimento de dsRNA dos genes alvos *KTI* ou *CTP8*, conjuntamente a dsREase, levou ao aumento significativo da eficiência do silenciamento de ambos os genes. Essa abordagem também foi utilizada em *Anthonomus grandis*, inseto coleóptero que apresenta recalcitrância ao RNAi (GARCIA et al., 2017). Em *A. grandis* foram identificadas três nucleases no transcriptoma desse inseto, as quais apresentam grau de similaridade com as endonucleases não específicas de DNA/RNA, e após a injeção de dsRNA do gene alvo acrescido de dsRNA dessas nucleases, também foi observado aumento significativo da eficiência do RNAi. Já na utilização de abordagem similar, porém com o emprego da ferramenta CRISPR/Cas9 para nocautear a REase de *H. armigera*, não foi possível observar aumento significativo na eficiência do silenciamento gênico via RNAi, embora um aumento na estabilidade da molécula de dsRNA tenha sido observada (GUAN et al., 2019).

Após a implementação do ensaio, foi observado que as lagartas de todos os tratamentos, incluindo dieta artificial sem a adição de bactérias *E. coli* HT115 (DE3) expressando dupla fita de RNA, não sobreviveram (Figura 15). Essa observação foi feita 1 dia após a implementação do ensaio. Nos 7 dias seguintes, foi realizado um acompanhamento, comprovando a mortalidade das lagartas. Dessa forma, foi levantado um questionamento sobre o método de inoculação das lagartas (na região central da dieta artificial). Sendo assim, foi realizado um teste para avaliar a sobrevivência e desenvolvimento de lagartas neonatas de *T. absoluta* em dieta artificial (BAJONERO; PARRA, 2017) em 3 formas de inoculação, conforme descrito abaixo (item 4.6.).

Figura 15. A – Dieta artificial de *T. absoluta* com 65 µL das suspensões bacterianas coradas com corante azul sobre a dieta artificial; B – Detalhe do local de inoculação das lagartas neonatas de *T. absoluta*, ao centro da dieta artificial; C – Observação da mortalidade das lagartas de *T. absoluta* 7 dias após a inoculação. As setas vermelhas indicam as lagartas de *T. absoluta*.

4.5. Avaliação da forma de inoculação de *T. absoluta* em dieta artificial

Com o objetivo de avaliar a correta forma de inoculação de lagartas neonatas de *T. absoluta* em dieta artificial, foi conduzido um ensaio com 3 formas distintas de inoculação (Figura 5). Na apresentação dos resultados, os mesmos foram denominados de “A” para a inoculação de lagartas na região da fina película de dieta artificial na lateral do tubo; “B” para inoculação de lagartas na região central da dieta artificial contendo fina película de dieta na lateral do tubo; “C” para inoculação de lagartas na região lateral da dieta artificial sem a fina película de dieta artificial na lateral do tubo. No ensaio descrito anteriormente (item 4.4.4), as lagartas neonatas de *T. absoluta* foram inoculadas na região central da dieta artificial em tubos que continham a fina película de dieta na lateral do tubo (B). Essa fina película criada na lateral do tubo, aumenta a área coberta disponível para a alimentação e simula a condição natural de alimentação das lagartas de *T. absoluta* que se alimentam naturalmente da lâmina foliar, o que pode levar ao aumento da taxa de sobrevivência desses insetos (BAJONERO; PARRA, 2017).

A avaliação da mortalidade larval demonstrou que a menor mortalidade, ou seja, a maior viabilidade, foi observada quando as lagartas foram inoculadas na fina película de dieta artificial na lateral do tubo (A), apresentando apenas 13,33% de mortalidade. Em seguida, apresentou mortalidade intermediária, com índice de 30%, a inoculação realizada na região central da dieta artificial em tubos contendo a fina película na lateral do tubo (B). A maior mortalidade foi observada em tubos sem a formação da fina película na lateral do tubo e inoculação na lateral da dieta artificial apresentando índice de 43,33% (C).

Figura 16. Mortalidade da fase larval de *Tuta absoluta* em dieta artificial (“A” - inoculação de lagartas na região da fina película de dieta artificial na lateral do tubo; “B” - inoculação de lagartas na região central da dieta artificial contendo fina película de dieta na lateral do tubo; “C” - inoculação de lagartas na região lateral da dieta artificial sem a fina película de dieta artificial na lateral do tubo. Colunas com letras iguais não diferiram pela análise de desvios (GLM, $p < 0,05$).

Sobre a duração do período larval das lagartas sobreviventes, foi observado uma menor duração no tratamento em que a inoculação foi realizada na região central da dieta artificial em tubos contendo a fina película na lateral (B), seguido de duração intermediária no tratamento em que as lagartas foram inoculadas na fina película de dieta artificial na lateral do tubo (A). A maior duração do período larval foi observada no tratamento em que as lagartas foram inoculadas na lateral da dieta artificial em tubos sem a formação da fina película na lateral do tubo (C) (Tabela 5).

Tabela 5. Duração do período larval de lagartas de *Tuta absoluta* sobreviventes inoculadas de diferentes formas em dieta artificial (“A” - inoculação de lagartas na região da fina película de dieta artificial na lateral do tubo; “B” - inoculação de lagartas na região central da dieta artificial contendo fina película de dieta na lateral do tubo; “C” - inoculação de lagartas na região lateral da dieta artificial sem a fina película de dieta artificial na lateral do tubo. Colunas com letras diferentes diferiram pelo teste de Tukey ($p=0,0437$).

Tratamentos	Duração do período larval (dias)
A	21,27 ab
B	20,19 a
C	23,53 b

Com esse ensaio, foi possível concluir que a alta mortalidade observada no ensaio anterior está relacionada com a forma que as lagartas neonatas de *T. absoluta* foram inoculadas, na região central da dieta artificial em tubos contendo a fina película de dieta na lateral do tubo (B). A taxa de mortalidade observada no tratamento B foi de 30%, ou seja, apresentou viabilidade de 70%. Esse valor de viabilidade se encontra abaixo dos 77% observados na primeira geração de criação em dieta artificial de *T. absoluta* descrito por Bajonero e Parra (2017), o que pode configurar uma inadequação do método de inculação. Por outro lado, devido a alta viabilidade observada no tratamento A, apenas 13,33% de mortalidade, essa forma de inculação pode ser considerada a mais indicada para a inculação de lagartas neonatas de *T. absoluta* em dieta artificial.

5. CONCLUSÕES

Tuta absoluta apresenta dois membros da nova família de proteínas denominadas de REase, *TaREaseI* e *TaREaseII*, potencialmente responsáveis pela degradação de dsRNA e presumidamente relacionados com a eficiência do RNAi nesse inseto-praga.

Não foram observadas diferenças significativas na expressão relativa dos genes *TaREaseI* e *TaREaseII* após o fornecimento de dsGFP a lagartas neonatas de *T. absoluta*. Porém, apesar do padrão observado na expressão relativa de *TaREaseI*, se faz necessária a repetição do ensaio.

A melhor forma de realizar a inoculação de lagartas neonatas de *T. absoluta* em dieta artificial é na região da fina película de dieta artificial criada na lateral do tubo.

REFERÊNCIAS

- AATHMANATHAN, V. S.; JOTHI, N.; PRAJAPATI, V. K.; KRISHNAN, M. Investigation of immunogenic properties of Hemolin from silkworm, *Bombyx mori* as carrier protein: an immunoinformatic approach. **Scientific Reports**, v. 8, p. 6957, 2018.
- ABRIEUX, A.; CHIU, J. C. Oral delivery of dsRNA by microbes: Beyond pest control. **Communicative & Integrative Biology**, v. 9, n. 6, p. 1–4, 2016.
- ARAVIN, A. A.; NAUMOVA, N. M.; TULIN, A. V.; VAGIN, V. V.; ROZOVSKY, Y. M.; GVOZDEV, V. A. Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. **Current Biology**, v. 11, n. 13, p. 1017–27, 2001.
- 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, n. 1, p. 163–172, 2014.
- BAJONERO, J. G.; PARRA, J. R. P. Selection and Suitability of an Artificial Diet for *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Based on Physical and Chemical Characteristics. **Journal of insect science**, v. 17, n. 1, p. 13, 2017.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.
- 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, n. 11, 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, n. 1, 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, n. 3, p. 1861–70, 2005.
- BENTO, F. M. M.; MARQUES, R. N.; CAMPANA, F. B.; DEMÉTRIO, C. G. B.; LEANDRO, R. A.; PARRA, J. R. P.; FIGUEIRA, A. Gene silencing by RNAi via oral delivery of dsRNA by bacteria in the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science**, v. 76, n. 1, p. 287–295, 2019.
- 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, n. 3, p. 267–271, 2002.

BOGORNİ, P. C.; CARVALHO, G. S. **Biologia de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em diferentes cultivares de *Lycopersicon esculentum* mill.** [s.l.: s.n.].

BOUTROS, M.; AHRINGER, J. The art and design of genetic screens: RNA interference. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 7, p. 554–566, 2008.

CAGLIARI, D.; DIAS, N. P.; GALDEANO, D. M.; DOS SANTOS, E. Á.; SMAGGHE, G.; ZOTTI, M. J. Management of Pest Insects and Plant Diseases by Non-Transformative RNAi. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1319, 2019.

CAMARGO, R. A.; BARBOSA, G. O.; POSSIGNOLO, I. P.; PERES, L. E. P.; LAM, E.; LIMA, J. E.; FIGUEIRA, A.; MARQUES-SOUZA, H. RNA interference as a gene silencing tool to control *Tuta absoluta* in tomato (*Solanum lycopersicum*). **PeerJ**, v. 4, p. e2673, 2016.

CAMARGO, R. D. 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 identify potential gene targets for RNAi-mediated control of the tomato leafminer (*Tuta absoluta*). **BMC Genomics**, v. 16, p. 635, 2015.

CAMPOS, M. R.; BIONDI, A.; ADIGA, A.; GUEDES, R. N. C.; DESNEUX, N. From the Western Palaearctic region to beyond: *Tuta absoluta* 10 years after invading Europe. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 3, p. 787–796, 2017.

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, n. 8, p. e103235, 2014.

CAO, M.; GATEHOUSE, J. A.; FITCHES, E. C. A systematic study of RNAi effects and dsRNA stability in *Tribolium castaneum* and *Acyrtosiphon pisum*, following injection and ingestion of analogous dsRNAs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 1079, 2018.

CARMELL, M. A.; XUAN, Z.; ZHANG, M. Q.; HANNON, G. J. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Genes & Development**, v. 16, p. 2733–2742, 2002.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. 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, n. 9, p. 1155–1162, 2011.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 12, 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.** [s.l.] Embrapa Informação Tecnológica, 1987. v. 22

COOPER, A. M. W.; SILVER, K.; ZHANG, J.; PARK, Y.; YAN, K. Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. **Pest Management Science**, v. 75, p. 18–28, 2019.

DEMÉTRIO, C. G. B.; HINDE, J.; MORAL, R. A. Models for Overdispersed Data in Entomology. In: **Ecological Modelling Applied to Entomology**. [s.l.] Springer International Publishing, 2014. p. 219–259.

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, n. 4, p. 403–408, 2011.

DESNEUX, N.; WAJNBERG, E.; WYCKHUYS, K. A. G.; BURGIO, G.; ARPAIA, S.; NARVÁEZ-VASQUEZ, C. A.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; CATALÁN RUESCAS, D.; 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, n. 3, p. 197–215, 2010.

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

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, n. 15, p. 9, 2004.

FAGARD, M.; BOUTET, S.; MOREL, J.-B.; BELLINI, C.; VAUCHERET, H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 21, p. 11650–11654, 2000.

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. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da 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.

FLETCHER, S. J.; REEVES, P. T.; HOANG, B. T.; MITTER, N. A Perspective on RNAi-Based Biopesticides. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 51, 2020.

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, n. 3, p. e0171847, 2017.

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, n. 1, p. 9, 2017.

GARCIA, R. A.; PEPINO MACEDO, L. L.; DO NASCIMENTO, D. C.; GILLET, F. X.; MOREIRA-PINTO, C. E.; FAHEEM, M.; BASSO, A. M. M.; MATTAR SILVA, M. C.; GROSSI-DE-SA, M. F. Nucleases as a barrier to gene silencing in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. 1–22, 2017.

GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 2, p. 94–108, 2009.

GIUSTOLIN, T. A.; VENDRAMIM, J. D. Effect of the allelochemicals 2-tridecanone and 2-undecanone on the biology of *Tuta absoluta* (Meyrick). **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, v. 25, n. 3, p. 417–422, 1996.

GIUSTOLIN, T. A.; VENDRAMIM, J. D.; PARRA, J. R. P. Número de ínstar larvais de *Tuta absoluta* (Meyrick) em genótipos de tomateiro. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 2, p. 393–396, 2002.

GOLDEN, D. E.; GERBASI, V. R.; SONTHEIMER, E. J. An Inside Job for siRNAs. **Molecular Cell**, v. 31, n. 3, p. 309–312, 2008.

GUAN, R.-B.; LI, H.-C.; FAN, Y.-J.; HU, S.-R.; CHRISTIAENS, O.; SMAGGHE, G.; MIAO, X.-X. A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 16, p. 6011–6021, 2018a.

GUAN, R.; HU, S.; LI, H.; SHI, Z.; MIAO, X. The in vivo dsRNA Cleavage Has Sequence Preference in Insects. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. 1768, p. 1–9, 2018b.

GUAN, R.; QIUYAN, C.; LI, H.; HU, S.; MIAO, X.; WANG, G.; YANG, B. Knockout of the *HaREase* Gene Improves the Stability of dsRNA and Increases the Sensitivity of *Helicoverpa armigera* to *Bacillus thuringiensis* Toxin. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 1368, 2019.

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, n. 2, p. 211–216, 2012.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. **Cell**, v. 81, n. 4, p. 611–620, 1995.

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, n. 7, 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, n. 2, p. 107–110, 1988.

HEAD, G. P.; CARROLL, M.; EVANS, S.; RULE, D. M.; WILLSE, A.; CLARK, T.; STORER, N.; FLANNAGAN, R.; SAMUEL, L.; MEINKE, L. J. Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO against WCR and NCR. **Pest Management Science**, v. 73, p. 1883–1899, 2017.

HIRAI, M.; TERENIUS, O.; LI, W.; FAYE, I. Baculovirus and dsRNA induce Hemolin, but no antibacterial activity, in *Antheraea pernyi*. **Insect Molecular Biology**, v. 13, n. 4, p. 399–405, 2004.

HUNTER, W. B.; GLICK, E.; PALDI, N.; BEXTINE, B. R. Advances in RNA interference: dsRNA Treatment in Trees and Grapevines for Insect Pest Suppression. **Southwestern Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 85–87, 2012.

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, 2009.

IVASHUTA, S.; ZHANG, Y.; WIGGINS, B. E.; RAMASESHADRI, P.; SEGERS, G. C.; JOHNSON, S.; MEYER, S. E.; KERSTETTER, R. A.; MCNULTY, B. C.; BOLOGNESI, R.; HECK, G. R. Environmental RNAi in herbivorous insects. **RNA**, v. 21, n. 1, p. 1–11, 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, p. 553, 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, n. 5, p. 394–404, 2010.

KATOCH, R.; SETHI, A.; THAKUR, N.; MURDOCK, L. L. RNAi for Insect Control: Current Perspective and Future Challenges. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 4, p. 847–873, 2013.

KOCH, A.; KOGEL, K.-H. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 821–831, 2014.

KRECHEMER, F. da S.; FOERSTER, L. A. *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): Thermal requirements and effect of temperature on development, survival, reproduction and longevity. **European Journal of Entomology**, v. 112, n. 4, p. 658–663, 2015.

KUNTE, N.; MCGRAW, E.; BELL, S.; AVILA, L. Prospects , challenges and current status of RNAi through insect feeding. **Pest Management Science**, v. 76, n. 1, p. 26–41, 2020.

LAMONTAGNE, B.; LAROSE, S.; BOULANGER, J.; ELELA, S. A. The RNase III Family: A Conserved Structure and Expanding Functions in Eukaryotic dsRNA Metabolism. **Curr. Issues Mol. Biol**, v. 3, n.4, p. 71-78, 2001.

LI, H.; GUAN, R.; GUO, H.; MIAO, X. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, n. 11, p. 2277–2285, 2015.

LI, X.; ZHANG, M.; ZHANG, H. RNA Interference of Four Genes in Adult *Bactrocera dorsalis* by Feeding Their dsRNAs. **PLOS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17788, 2011.

LIETTI, M. M. M.; BOTTO, E.; ALZOGARAY, R. A. Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 113–119, 2005.

LIPPMAN, Z.; MARTIENSSEN, R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 364–370, 2004.

LISA TIMMONS; DONALD L. COURT; ANDREW FIRE. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**, v. 263, p. 103–112, 2001.

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, n. 2, p. 47–59, 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $\Delta\Delta C_t$ Method. **METHODS**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LUO, Y.; CHEN, Q.; LUAN, J.; CHUNG, S. H.; VAN ECK, J.; TURGEON, R.; DOUGLAS, A. E. Towards an understanding of the molecular basis of effective RNAi against a global insect pest, the whitefly *Bemisia tabaci*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 88, p. 21–29, 2017.

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, n. 11, p. 1307–1313, 2007.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 21 set. 2018.

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, n. 5, p. 1128–1135, 2007.

MARTINEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; URLAUB, H.; LÜHRMANN, R.; TUSCHL, T. Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi. **Cell**, v. 110, n. 5, p. 563–574, 2002.

MASUMOTO, M.; YAGINUMA, T.; NIIMI, T. Functional analysis of Ultrabithorax in the silkworm, *Bombyx mori*, using RNAi. **Development Genes and Evolution**, v. 219, n. 9–10, p. 437–444, 2009.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 343–349, 2004.

MELLO, C. C.; CONTE, D. Revealing the world of RNA interference. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 338–342, 2004.

MICHEREFF, M.; FOTO, F.; DANIEL, E.; FOTO, S.; MOURA, A. P. **A traça-do-tomateiro no mundo**. [s.l.] Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2013.

MITTER, N.; WORRALL, E. A.; ROBINSON, K. E.; LI, P.; JAIN, R. G.; TAOCHY, C.; FLETCHER, S. J.; CARROLL, B. J.; LU, G. Q.; XU, Z. P. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. **Nature Plants**, v. 3, n. 2, p. 16207, 2017.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes *in trans*. **The Plant cell**, v. 2, n. 4, p. 279–289, 1990.

NIU, J.; TANING, C. N. T.; CHRISTIAENS, O.; SMAGGHE, G.; WANG, J. J. Rethink RNAi in Insect Pest Control: Challenges and Perspectives. In: **Advances in Insect Physiology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2018. 55p. 1–17.

NWOKEOJI, A. O.; KUNG, A. W.; KILBY, P. M.; PORTWOOD, D. E.; DICKMAN, M. J. Purification and characterisation of dsRNA using ion pair reverse phase chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1484, p. 14–25, 2017.

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, n. 2, p. 155–160, 2009.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. A evolução das dietas artificiais e suas interações em ciência e tecnologia. In: **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**. Embrapa In ed. [s.l.: s.n.]p. 1164.

PENG, Y.; WANG, K.; ZHU, G.; HAN, Q.; CHEN, J.; ESMAIL, M.; ELZAKI, A.; SHENG, C.; ZHAO, C.; REDDY, S. Identification and characterization of multiple dsRNases from a lepidopteran insect, the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 162, p. 86–95, 2020.

PERRIMON, N.; NI, J.-Q.; PERKINS, L. *In vivo* RNAi: Today and Tomorrow. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 8, p. 1–11, 2010.

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, n. 10, p. e25709, 2011.

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.

PRENTICE, K.; SMAGGHE, G.; GHEYSEN, G.; CHRISTIAENS, O. Nuclease activity decreases the RNAi response in the sweetpotato weevil *Cylas puncticollis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 110, p. 80–89, 2019.

PRICE, D. R. G.; GATEHOUSE, J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 7, 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, n. 3, p. 217–22, 2002.

QUIROZ, E. C. Nuevos Antecedentes Sobre La Biología De La Polilla Del Tomate, *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick). v. 2, p. 82–86, 1976.

RODITAKIS, E.; VASAKIS, E.; GARCÍA-VIDAL, L.; DEL ROSARIO MARTÍNEZ-AGUIRRE, M.; RISON, J. L.; HAXAIRE-LUTUN, M. O.; NAUEN, R.; TSAGKARAKOU, A.; BIELZA, P. A four-year survey on insecticide resistance and likelihood of chemical control failure for tomato leaf miner *Tuta absoluta* in the European/Asian region. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 1, p. 421–435, 2018.

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, n. 1, p. 9–16, 2015.

RODRIGUES, T. B.; FIGUEIRA, A. Management of Insect Pest by RNAi-A New Tool for Crop Protection. In: **RNA Interference**. 1ed. ed. [s.l.] InTech, 2016.

ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 22, p. 3343–3353, 1992.

SALAZAR, E.; ARAYA, J. Detección de resistencia a insecticidas em la Polilla del Tomate. **Simiente**, v. 67, n. 1–2, p. 8–22, 1997.

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

SANTANA, P. A.; KUMAR, L.; DA SILVA, R. S.; PICANÇO, M. C. Global geographic distribution of *Tuta absoluta* as affected by climate change. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 4, p. 1373–1385, 2019.

SANTOS, D.; VANDEN BROECK, J.; WYNANT, N. Systemic RNA interference in locusts: Reverse genetics and possibilities for locust pest control. **Current Opinion in Insect Science**, v. 6, p. 9–14, 2014.

SHAH, C.; FÖRSTEMANN, K. Monitoring miRNA-mediated silencing in *Drosophila melanogaster* S2-cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1779, n. 11, p. 766–772, 2008.

SHI, J.-F.; MU, L.-L.; CHEN, X.; GUO, W.-C.; LI, G.-Q. RNA interference of *chitin synthase* genes inhibits chitin biosynthesis and affects larval performance in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **International journal of biological sciences**, v. 12, n. 11, p. 1319–1331, 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, n. 8, p. 913–920, 2011.

SIQUEIRA, H. A. A.; GUEDES, R. N. C.; FRAGOSO, D. B.; MAGALHAES, L. C. Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **International Journal of Pest Management**, v. 47, n. 4, p. 247–251, 2001.

SIQUEIRA, H. A. A.; GUEDES, R. N. C.; PICANÇO, M. C. Cartap resistance and synergism in populations of *Tuta absoluta* (Lep., Gelechiidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 124, p. 233–238, 2000a.

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, 2000b.

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, n. 10, p. 7312–7319, 2007.

SOUZA, J. C.; REIS, P. R. **Traça-do-tomateiro: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos e controle**. Boletim Té ed. [s.l.] Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 1992.

SPIT, J.; PHILIPS, A.; WYNANT, N.; SANTOS, D.; PLAETINCK, G.; VANDEN, J. Knockdown of nuclease activity in the gut enhances RNAi efficiency in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, but not in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 81, p. 103–116, 2017.

TABULOC, C. A.; LEWALD, K. M.; CONNER, W. R.; LEE, Y.; LEE, E. K.; CAIN, A. B.; GODFREY, K. E.; ARNÓ, J.; AGUSTÍ, N.; PERINI, C. R.; GUEDES, J. C.; ZALOM, F. G.; CHIU, J. C. Sequencing of *Tuta absoluta* genome to develop SNP genotyping assays for species identification. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 4, p. 1397–1407, 2019.

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.; DE 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.; GROOT, A. T.; HAUSER, F.; HECKEL, D. G.; HEGEDUS, D. D.; HRYCAJ, S. B.; HUANG, L. C.; JOEHULL, J. D.; IATROU, K. F.; IGA, M.; KANOST, M. R.; KOTWICA, J.; LI, C. C.; LI, J. C.; LIU, J.; LUNDMARK, M.; MATSUMOTO, S. D.; MEYERING-VOS, M. G.; MILLICHAP, P. J.; NIA MONTEIRO, A. H.; MRINAL, N.; NIIMI, T. I.; NOWARA, D.; OHNISHI, A. D.; OOSTRA, V. J.; OZAKI, K. K.; PPAKONSTANTINO, M. F.; POPADIC, A. B.; RAJAM L, M. V.; SAENKO, S. J.; SIMPSON, R. M.; SOBERÓ, M.; STRAND, M. R.; TOMITA, S. M.; TOPRAK, U.; WANG, P. C.; WEI WEE, C. O.; WHYARD, S. P.; ZHANG, W. Q.; NAGARAJU, J.; FRENCH-CONSTANT, R. H.; HERRERO, S.; GORDON, K.; SWEVERS, L. F.; 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 bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. **PloS ONE**, v. 4, n. 7, p. e6225, 2009.

TOMITA, S.; KIKUCHI, A. Abd-B suppresses lepidopteran proleg development in posterior abdomen. **Developmental Biology**, v. 328, n. 2, p. 403–409, 2009.

TSUZUKI, S.; SEKIGUCHI, S.; KAMIMURA, M.; KIUCHI, M.; HAYAKAWA, Y. A cytokine secreted from the subesophageal body is essential for morphogenesis of the insect head. **Mechanisms of Development**, v. 122, n. 2, p. 189–197, 2005.

TURNER, C. T.; DAVY, M. W.; MACDIARMID, R. M.; PLUMMER, K. M.; BIRCH, N. P.; NEWCOMB, R. D. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 3, p. 383–391, 2006.

UCHOA-FERNANDES, M. A.; LUCIA, T. M. C. della; VILELA, E. F. Mating, oviposition and pupation of *Scrobipalpus absoluta* (Meyr.) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, n. 1, p. 159–164, 1995.

UPADHYAY, S. K.; CHANDRASHEKAR, K.; THAKUR, N.; VERMA, P. C.; BORGIO, J. F.; SINGH, P. K.; TULI, R. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. **Journal of Biosciences**, v. 36, n. 1, p. 153–161, 2011.

URBANEJA, A.; DESNEUX, N.; GABARRA, R.; ARNÓ, J.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; MAFRA NETO, A.; STOLTMAN, L.; PINTO, A. de S.; PARRA, J. R. P. Biology, ecology and management of the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. In: **Potential invasive pests of agricultural crops**. Wallingford: CABI, 2013. p. 98–125.

VAGIN, V. V.; SIGOVA, A.; LI, C.; SEITZ, H.; GVOZDEV, V.; ZAMORE, P. D. A Distinct Small RNA Pathway Silences Selfish Genetic Elements in the Germline. **Science**, v. 313, p. 320–324, 2006.

VAN DER KROL, A. R.; MUR, L. A.; BELD, M.; MOL, J. N.; STUTTJE, A. R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **The Plant cell**, v. 2, n. 4, p. 291–9, 1990.

VARGAS, H. Observaciones sobre la biología y enemigos naturales de la polilla del tomate, *Gnorimoschema absoluta*. (Meyrick). (Lep. Gelechiidae). **Idesia**, v. 1, p. 75–110, 1970.

VAZQUEZ, F.; VAUCHERET, H.; RAJAGOPALAN, R.; LEPERS, C.; GASCIOLLI, V.; MALLORY, A. C.; HILBERT, J.-L.; BARTEL, D. P.; CRÉTÉ, P. Endogenous *trans*-Acting siRNAs Regulate the Accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. **Molecular Cell**, v. 16, n. 1, p. 69–79, 2004.

WANG, K.; PENG, Y.; PU, J.; FU, W.; WANG, J.; HAN, Z. Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation *in vivo*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 77, p. 1–9, 2016.

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, n. 4, p. e18644, 2011.

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.

XU, J.; MON, H.; KUSAKABE, T.; LI, Z.; ZHU, L.; IYAMA, 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, n. 24, p. 10435–10444, 2013.

XU, J.; WANG, X.-F.; CHEN, P.; LIU, F.-T.; ZHENG, S.-C.; YE, H.; MO, M.-H.; 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. 10, p. 88, 2016.

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, n. 2, p. 389–396, 2014.

XU, W.; HAN, Z. Cloning and phylogenetic analysis of sid-1-like genes from aphids. **Journal of Insect Science**, v. 8, p. 30, 2008.

YANG, J.; HAN, Z. Optimisation of RNA interference-mediated gene silencing in *Helicoverpa armigera*. **Austral Entomology**, v. 53, n. 1, p. 83–88, 2014a.

YANG, J.; HAN, Z. Efficiency of Different Methods for dsRNA Delivery in Cotton Bollworm (*Helicoverpa armigera*). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, n. 1, p. 115–123, 2014b.

YANG, Y.; ZHU, Y. C.; OTTEA, J.; HUSSENER, C.; ROGERS LEONARD, B.; 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, n. 8, p. 592–603, 2010.

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 separata* (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 48, p. 431–439, 2013.

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.

ZHA, W.; PENG, X.; CHEN, R.; DU, B.; ZHU, L.; HE, G. Knockdown of Midgut Genes by dsRNA-Transgenic Plant-Mediated RNA Interference in the Hemipteran Insect *Nilaparvata lugens*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e20504, 2011.

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, n. 6225, p. 991–994, 2015a.

ZHANG, J.; KHAN, S. A.; HECKEL, D. G.; BOCK, R. Next-Generation Insect-Resistant Plants: RNAi-Mediated Crop Protection. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 871–882, 2017.

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, n. 05, p. 584–591, 2013.

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, n. e52523, p. 1–11, 2015b.

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

ZHU, F.; XU, J.; PALLI, R.; FERGUSON, J.; PALLI, S. R. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle , *Leptinotarsa decemlineata*. **Pest Management Science**, v. 67, p. 175–182, 2011.

ZHUANG, J. J.; HUNTER, C. P. RNA interference in *Caenorhabditis elegans*: Uptake, mechanism, and regulation. **Parasitology**, v. 139, p. 560–573, 2012.