UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

IGHOR LUIZ AZEVEDO TEIXEIRA

**Silenciamento dos genes *fruitless* e *period*: efeitos no
comportamento locomotor e reprodutivo de *Anastrepha* sp.1
affinis fraterculus (Diptera; Tephritidae)**

SÃO PAULO
2017

IGHOR LUIZ AZEVEDO TEIXEIRA

Silenciamento dos genes *fruitless* e *period*: efeitos no comportamento locomotor e reprodutivo de *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus* (Diptera; Tephritidae)

Silencing of genes *fruitless* and *period*: effects in locomotor and reproductive behavior of *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus* (Diptera, Tephritidae)

Exemplar corrigido. O original encontra-se depositado no Instituto de Biociências-USP

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Genética e Biologia Evolutiva

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Paranhos Perondini

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução de divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

Teixeira, Ighor Luiz Azevedo

Silenciamento dos genes *fruitless* e *period*: efeitos no comportamento locomotor e reprodutivo de *Anastrepha sp.1 affinis fraterculus* (Diptera, Tephritidae). / Ighor Luiz Azevedo Teixeira ; orientador: André Luiz Paranhos Perondini. – 2017

75 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Biologia/Genética, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017

1. Moscas-das-frutas. 2. Pragas da fruticultura. 3. Atividade gênica. 4. Reprodução. 5. RNA interferente. I. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

Aos meus pais, por
acreditarem sempre em
mim, pelo apoio e toda
a luta, mesmo nas
situações mais difíceis

*“Inteligência é a
capacidade de se
adaptar à mudança”.*

(Stephen Hawking)

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. André Luiz Paranhos Perondini,
Pela excelente orientação, por estar sempre presente, e por
todo o suporte durante todo o meu doutorado

À Profa. Denise Selivon,
Primeiramente pela oportunidade, vir à São Paulo foi a melhor coisa
que me aconteceu, tanto na minha vida profissional, quanto pessoal,
e segundo pela orientação e por todas as nossas conversas. Você é
uma pessoa maravilhosa.

Ao Pietro,
Pela amizade, pela ajuda em inúmeros experimentos, pelo suporte
sempre que possível e por todas as nossas discussões científicas que em
muito ajudaram na construção dessa tese.

Ao Prof. Celso Luis Marino pelo estágio no IBTEC – UNESP Botucatu e ao
Bruno Rossini, pelo auxílio com os experimentos necessários ao
desenvolvimento do projeto.

À todos os alunos do laboratório,
Paula, Ester, Rebecca e Fernando, além de todas as outras pessoas que
conviveram comigo nesse tempo, por todos os bons momentos vividos,
todos vocês têm um enorme espaço no meu coração.

A D.^a Elzy e ao Carlos,
por propiciar as condições necessárias para o desenvolvimento
do trabalho, mantendo a criação das moscas, além de estarem
sempre dispostos a ajudar.

A Ghísela,

Por sempre ouvir minhas lamúrias, por estar sempre comigo, me apoiando e me ajudando sempre que foi preciso.

Aos meus amigos,

Por me proporcionarem o convívio social necessário para suportar todo o estresse e ansiedade e me ajudarem a superar todas as crises depressoras associadas a produção de uma tese de doutorado.

Ao departamento de Genética e Biologia Evolutiva, ao Instituto de Biociências, à Universidade de São Paulo e toda a sua estrutura e pessoal por terem provido todos os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho

Apoio financeiro,
Bolsa institucional de
doutorado – CNPq

Índice

Resumo

Summary

1- Introdução	1
2- Objetivos	12
3- Materiais e Métodos	13
3.1 Espécie	13
3.2 Amplificação de fragmentos dos genes <i>period</i> e <i>fruitless</i>	13
3.2.1 Extração de DNA genômico	13
3.2.2 Amplificação e sequenciamento de fragmento do gene <i>fruitless</i>	14
3.2.3 Amplificação e sequenciamento de fragmento do gene <i>period</i>	15
3.3 Síntese do dsRNA de <i>fruitless</i> e de <i>period</i>	15
3.3.1 Extração de RNA total	15
3.3.2 Síntese do dsRNA de <i>fruitless</i>	16
3.3.3 Síntese do dsRNA de <i>period</i>	18
3.4 RT-PCR para avaliar o silenciamento de <i>period</i> e <i>fruitless</i>	20
3.4.1 Amplificação de fragmentos de DNA de <i>fruitless</i> e <i>period</i>	21
3.5 Teste do método de injeção para silenciamento gênico	22
3.6 Silenciamento do gene <i>fruitless</i>	22
3.6.2 Silenciamento de <i>fruitless</i> : atividade dos machos	22
3.6.2 Silenciamento de <i>fruitless</i> : comportamento reprodutivo de machos	23
3.6.3 Silenciamento de <i>fruitless</i> por RNAi parental	23
3.7 Silenciamento do gene <i>period</i>	24
3.7.1 Silenciamento de <i>period</i> : atividade dos machos	24
3.7.2 Silenciamento de <i>period</i> : comportamento reprodutivo de machos	25
3.8 Silenciamento de <i>fruitless</i> e <i>period</i> em machos adultos: produção de espermatozoides	25
3.9 Análise de dados	27

4- Resultados	28
4.1 Amplificação e sequenciamento de fragmentos dos genes fruitless e period	28
4.1.1 Amplificação de fragmento de fruitless	28
4.1.2 Amplificação de fragmento de period	29
4.2 Síntese de dsRNA de period e fruitless	30
4.3. Silenciamento dos genes fruitless e period	31
4.4 Silenciamento gênico de fruitless no comportamento de machos	33
4.4.1 Análise da atividade dos machos	34
4.4.2 Análise do comportamento reprodutivo dos machos	35
4.4.3 Análise do comportamento de machos a partir do silenciamento de fruitless por RNAi parental	36
4.4.4 Produção de espermatozóides em machos com o gene fruitless silenciado	38
4.5 Análise do comportamento de machos a partir do silenciamento de period	38
4.5.1 Silenciamento de period: atividade dos machos	39
4.5.2 Silenciamento de period para análise do comportamento de cópula dos machos	40
4.5.3 Silenciamento de period: comportamento sexual de machos	41
4.5.4 Silenciamento de period: produção de espermatozóides	42
5- Discussão	44
6- Conclusões	51
7- Referências Bibliográficas	52

Resumo

O complexo de espécies crípticas de *Anastrepha fraterculus* compreende oito morfotipos dos quais três ocorrem no Brasil. *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* (A. sp.1) é o morfotipo Brasil-1 e é uma espécie de ampla distribuição no planalto sudeste/sul do Brasil e no norte da Argentina. O comportamento reprodutivo dessa espécie envolve uma série de movimentos desempenhados pelos machos para atrair as fêmeas para acasalamento. Dois genes, *period* e *fruitless*, entre outros, são conhecidos por participar do controle do comportamento reprodutivo de vários organismos, incluindo algumas espécies de moscas-das-frutas. O presente trabalho buscou informações sobre a atuação desses genes no comportamento reprodutivo de A. sp.1, utilizando o silenciamento transitório desses genes pela metodologia de RNA interferente. Para tal, foram sintetizados RNAs de dupla-fita (dsRNAs) dos dois genes. RT-PCR foi feito após a injeção do dsRNA_{fru} ou dsRNA_{per} no abdômen de machos sexualmente maduros, tendo sido demonstrado que os genes estavam silenciados, sete a oito dias após a injeção. Interferências no comportamento de machos sexualmente maduros, com um ou outro gene silenciado, foram avaliados. Ao injetar dsRNA_{fru} em machos adultos de A. sp.1 foi observado que não houve alteração significativa nas suas atividades gerais. Porém, foi observado que houve uma diminuição significativa no número de machos que realizavam atividades reprodutivas, sugerindo que o silenciamento de *fruitless* no macho adulto altera o funcionamento normal do comportamento sexual masculino. Em contrapartida, ao injetar dsRNA_{per} em machos adultos de A. sp.1 não foi observada alteração significativa tanto nas suas atividades reprodutivas quanto nas atividades gerais. O silenciamento dos genes aparentemente não afeta a produção de espermatozoides. Esses dados corroboram o observado em *D. melanogaster*, em que o mutante nulo *per*⁰⁴ não apresenta alteração significativa nos seus comportamentos em relação aos machos selvagens em um regime cíclico Dia/Noite. Análises adicionais serão necessárias com o objetivo de elucidar as implicações desses dois genes no comportamento locomotor e reprodutivo de *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus*.

Summary

The complex of cryptic species *Anastrepha fraterculus* comprises eight morphotypes three of which occur in Brazil. *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* correspond to the morphotype Brazil-1 and is a species of wide distribution in the southeast/south plateau of Brazil and in north of Argentina. The reproductive behavior of this species involves a series of movements performed by males to attract females for mating. Two genes, *period* and *fruitless*, among others, are known to participate in the control of reproductive behavior of various organisms, including some species of fruit flies. The present work aimed to get information about the presumable role of these genes in the reproductive behavior of *A. sp.1*, using transient silencing of these genes by interfering RNA methodology. The double-stranded RNA (dsRNA) of the two genes were synthesized. RT-PCR Tests were made after injection of the dsRNA_{fru} or dsRNA_{per} into the abdomens of sexually mature males. These tests showed that the genes were silenced, seven to eight days after the injection. Interferences in the behavior of sexually mature males with one or other silenced gene were evaluated. Injection of dsRNA_{fru} in adult males of *A. sp.1* showed that they did not cause significant alterations in general activities, but it was observed that they cause a significant decrease in the number of males that performed reproductive activities, suggesting that silencing of *fruitless* alters the normal functioning of male sexual behavior. In contrast, when injecting dsRNA_{per} in adult males of *A. sp.1*, no significant alteration was observed neither in their reproductive activities nor in their general activities. Moreover, silencing of the genes seems not to affect the production of spermatozoa. The data are in line with observations in *D. melanogaster*, in which the null mutant *per*⁰⁴ did not present significant alterations in behaviors relatives to the control males in a Day/Night cyclic regime. Additional analyzes will be needed to elucidate the participation of the two genes in the coordination of behaviors in *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus*.

1. Introdução

A rotação e a translação da Terra gera mudanças na quantidade de luz e na temperatura no ambiente. Essas alterações são cíclicas e previsíveis, e estão relacionadas à evolução de um ciclo biológico ou circadiano nos seres vivos. O relógio biológico é sincronizado com o ciclo dia-noite, permitindo ao organismo se adaptar não só aos períodos diários de luz e escuro, mas também às alterações sazonais. A análise genômica dos ritmos circadianos em insetos e mamíferos, mostrou que os mecanismos são conservados. Isto abriu novos caminhos para a utilização de insetos como modelos na compreensão da regulação diária do comportamento ao nível molecular (Panda *et al.*, 2002).

O gene *period* foi o primeiro gene caracterizado que atua no ritmo circadiano ("genes relógio") a ser caracterizado em *Drosophila melanogaster* (Konopka e Benzer, 1971). Após este, o gene *timeless* foi isolado e exibiu ritmo molecular similar a *period*, apresentando níveis coincidentes de RNA mensageiro e de proteína nas estruturas corporais onde estes genes são expressos, ou seja, nos gânglios cerebrais da cabeça (Sehgal *et al.*, 1995). Comparações entre a região codificante do gene *period* de *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura*, e *D. virilis* revelou que o produto da tradução desse gene possui seis blocos de regiões conservadas (C1-C6) e cinco blocos de regiões não conservadas (N1-N5) (Colot *et al.*, 1988). A região conservada mais longa (C2) contém um domínio composto por duas regiões de 51 aminoácidos separadas por mais de 100 aminoácidos. Essas duas regiões possuem a função de heterodimerização proteína-proteína (Crews *et al.*, 1988). Esse domínio é homólogo com a proteína Single-minded (Sim) de *Drosophila* e com a proteína ARNT (*transportador nuclear de aril-hidrocarboneto*) de mamíferos, sendo assim, chamado de domínio PAS (Per, ARNT e Sim). A região C2 também contém o Domínio de Localização Citoplasmática (CLD), que está adjacente ao domínio PAS e está envolvido na retenção de Period no citoplasma (Sacz e Young, 1996). A região não conservada N2 inclui, em *D. melanogaster*, a

repetição Treonina-Glicina (TG), que possui grande variação de comprimento em dípteros e está sobre seleção positiva (Costa e Kyriacou, 1998). A região conservada C1 contém um Sinal de Localização Nuclear (NLS) que possui a função de direcionar a proteína Period para o núcleo através do poro nuclear (Vosshall *et al.*, 1994; Saez e Young, 1996). Por fim, dentro das regiões conservadas C3, C4 e C5 do gene *period* há um Domínio de Inibição Clock-Cycle (CCID), que é responsável por se ligar e inibir a transcrição dos genes *dclk* e *cyc* (Chang e Reppert, 2003).

Figura 1: Representação esquemática do gene *period* de *Ceratitidis capitata*. Introns estão numerados. Caixas abertas representam região 5' não traduzida. Domínios com função conservada estão rotuladas (NLS, PAS, CLD, TG e CCID) (Redesenhado de Mazzotta *et al.*, 2005).

Nas proteínas ARNT e Sim há também o domínio básico-hélice-alça-hélice (bHLH), que é uma região de ligação com o DNA (Hoffman *et al.*, 1991; Crews *et al.*, 1988). Os promotores de *per* e *tim* possuem uma região chamada de E-box (sítio de ligação com o domínio bHLH) e um elemento regulatório transcrricional (Hao *et al.*, 1997; Darlington *et al.*, 1998). Dois "genes relógio" adicionais foram identificados em *Drosophila* com ortólogos em mamíferos, *dclock* (*dclk*) e *cycle* (*cyc*), que codificam proteínas contendo, ambos, os domínios PAS e bHLH. Estas duas proteínas heterodimerizam e se ligam diretamente na região E-box encontrada nos promotores de *tim* e *per*,

ativando assim, as suas expressões (Darlington *et al.*, 1998; Rutila *et al.*, 1998; Allada *et al.*, 1998).

Os genes *period* e *timeless* compõem o núcleo de um ciclo de transcrição. Os níveis das proteínas Per e Tim aumentam ao longo do dia, até atingir os seus níveis máximos no início da noite (algumas horas após o pico de RNAm de *per* e *tim*). As duas proteínas heterodimerizam e se translocam para os núcleos das células durante a noite, onde se ligam e inibem a atividade de transcrição do complexo dClk/Cyc, reprimindo assim, a sua própria transcrição. Ambas as proteínas são progressivamente fosforiladas por Doubletime (DBT), levando à sua degradação no fim da noite. Com isso, a inibição do complexo DClk/ Cyc é relaxada e ativa a transcrição dos genes *per* e *tim* durante a manhã, dando início a um novo período de acumulação dessas proteínas, fechando o ciclo molecular (Darlington *et al.*, 1998). Este mecanismo é conservado em insetos e mamíferos, por mais de 600 milhões de anos de história evolutiva (Darlington *et al.*, 1998; Rutila *et al.*, 1998; Allada *et al.*, 1998; Hogenesch *et al.*, 1998; Gekakis *et al.*, 1998).

Em *Drosophila melanogaster*, o gene *period* controla a atividade de locomoção durante os períodos de vigília/repouso e também o horário de acasalamento das fêmeas (Sakai e Ishida, 2001). Um estudo feito com as moscas-das-frutas *Bactrocera tryoni* e *Bactrocera neohumeralis* (Tephritidae), mostrou que ambas possuem o mesmo padrão circadiano de expressão de RNAm de *period* (Miyatake *et al.*, 2002). Porém, *Bactrocera neohumeralis* acasala durante o meio do dia, quando a intensidade de luz é maior e *Bactrocera tryoni* acasala no fim da tarde, quando há menor luminosidade (Pike e Meats, 2002). Em *Ceratitis capitata* também foi demonstrado que o gene *period* possui o mesmo padrão circadiano de expressão de RNAm de *Drosophila melanogaster*, entretanto, os níveis de proteína Period não sofreram oscilação circadiana durante o dia, contrastando com o observado em *D. melanogaster* (Siwicki *et al.*, 1988; Hardin *et al.*, 1990; Edery *et al.*, 1994). Além disso, linhagens transgênicas de *D. melanogaster* contendo o gene *period* de *C. capitata* no lugar do seu gene *period* endógeno, mostraram que o gene de *period* de *C. capitata* não consegue resgatar a atividade

locomotora das linhagens selvagens (Mazzotta *et al.*, 2005). Estes dados sugerem que apesar de *period* ser um gene central para a regulação do ritmo circadiano em *Drosophila melanogaster*, este gene atua de uma maneira distinta em Tephritidae. Além disso, a influência de *Period* sobre o horário de acasalamento em Tephritidae ainda não está esclarecida.

Além da variação do horário de corte e cópula em insetos, existem também diferenças nos rituais de acasalamento incluindo sons, danças, presentes nupciais, toque físico e, até mesmo, o uso de substâncias afrodisíacas (Aluja, 1994; Salvemini *et al.*, 2010). Em *Drosophila melanogaster*, os machos executam uma série de etapas de corte. Quando perto de uma fêmea, machos de *Drosophila* vibram as asas produzindo sons específicos da espécie e que exercem um efeito afrodisíaco na fêmea (Hall, 1994; Greenspan e Ferveur, 2000; Shirangi e McKeown, 2007; Kimura *et al.*, 2008). Esse ritual complexo de acasalamento constitui um exemplo de comportamento espécie-específico inato e que, na sua maioria, não exige qualquer experiência sensorial ou comportamental anterior do indivíduo ou qualquer contato com outros membros da espécie. Isso sugere uma regulação genética dos comportamentos envolvidos na corte e cópula, tanto em machos quanto em fêmeas de *Drosophila melanogaster* (Salvemini *et al.*, 2010).

Um desses genes é o *fruitless* (*fru*) que regula quase todos os aspectos do comportamento sexual dos machos em *Drosophila*. Machos mutantes para este gene mostram alterações na corte que levam à uma “esterilidade comportamental” e também a altos níveis de corte macho/macho (Ryner *et al.*, 1996). O gene *fruitless* atua no sistema nervoso central de *Drosophila melanogaster* para estabelecer o comportamento sexual dos machos (Demir e Dickson, 2005; Stockinger *et al.*, 2005).

É importante notar que a atividade do gene *fruitless* é regulada pela cascata de genes que determinam o sexo em *Drosophila*. Em *Drosophila melanogaster*, a determinação sexual ocorre durante o desenvolvimento e é regulada por uma série hierárquica de genes sendo que cada gene dessa cascata regula, por “splicing” sexo-específico, o pré-RNAm do gene que está

a jusante (Sánchez, 2008). O gene *Sex-lethal* (*Sxl*) está no topo da cascata e seu produto protéico atua no “splicing” sexo-específico do seu próprio pre-RNAm, resultando na produção de proteína *Sxl* funcional nas fêmeas, mas não em machos (Bell *et al.*, 1988; Bell *et al.*, 1991). A proteína funcional *Sxl* também controla o “splicing” fêmea-específico do pre-RNAm do gene *transformer* (*tra*), resultando em proteína *Tra* funcional em fêmeas (Boggs *et al.*, 1987; Belote *et al.*, 1989; Valcárcel *et al.*, 1993). O produto *Tra* funcional e o produto do gene constitutivo *transformer-2* (*tra-2*) controlam o “splicing” fêmea-específico do pre-RNAm do gene *doublesex* (*dsx*), dando origem a *DsxF* (Hedley e Maniatis, 1991; Hertel *et al.*, 1996; Ryner e Baker, 1991; Tian e Maniatis, 1993). Em machos, como o a proteína *Sex-lethal* não é funcional, o “splicing” do gene *tra* resulta em proteína *Tra* não funcional e não há formação de complexo *Tra/Tra2*. Assim o pré-RNAm de *dsx* sofre um “splicing” macho-específico dando origem a *DsxM* (Sánchez, 2008). *DsxF* e *DsxM* são fatores de transcrição que impõem desenvolvimento sexual feminino e masculino, respectivamente, através da regulação sexo-específica dos chamados genes de citodiferenciação sexual (Burtis e Baker, 1989; Hoshijima *et al.*, 1991).

Sabe-se que a proteína *Transformer* funcional (fêmeas) se liga a *fru* resultando em “splicing” sexo-específico de *fru*, reprimindo a sua tradução em fêmeas. Em machos, como não há proteína *Tra* funcional, a proteína *Fru^M* é produzida em pequenos grupos de neurônios, onde atua em um circuito neural dedicado ao comportamento de corte de machos (Ito *et al.*, 1996; Ryner *et al.*, 1996; Manoli *et al.*, 2005; Usui-Aoki *et al.*, 2000).

Embora o mesmo circuito esteja presente nas fêmeas, *Fru^M* exerceria o seu efeito através da modulação de sua função, e não na montagem deste circuito. O período crítico para *Fru^M* modular a função deste circuito parece ocorrer durante o desenvolvimento, pois machos adultos começam a exibir o comportamento de corte logo após a emergência, sem qualquer exposição prévia a outros machos. Além disso, experimentos envolvendo a expressão condicional do gene *transformer* em *Drosophila*, sugeriram que o comportamento dos machos é programado no estágio de pupa (Arthur *et al.*,

1998), período que coincide com o início da síntese de Fru^M em um crescente número de neurónios no sistema nervoso dos machos (Lee *et al.*, 2000).

Sabe-se que Fru^M não atua sozinho para estabelecer comportamento sexual masculino. O gene *doublesex* além de atuar na citodiferenciação sexual impondo desenvolvimento sexual masculino e feminino, também é requerido para um comportamento sexual masculino normal e completo. Dessa maneira, Fru^M e Dsx^M são requeridos ao mesmo tempo para o funcionamento normal do comportamento sexual masculino. Isso foi demonstrado quando fêmeas transgênicas de *D. melanogaster* expressando Fru^M e Dsx^F apresentaram comportamento sexual masculino incompleto. Porém, fêmeas transgênicas expressando as versões masculinas de ambos os genes restabeleceu completamente o comportamento sexual masculino (Rideout *et al.*, 2007; von Schlichte e Hall, 1979).

A cascata de determinação do sexo em moscas-das-frutas (Tephritidae) já foi estudada nos gêneros *Bactrocera*, *Ceratitidis* e *Anastrepha* e difere de *Drosophila* pelo fato do gene *Sex-lethal* não participar do mecanismo (Ruiz *et al.*, 2005, 2007a, 2007b; Sánchez, 2008; Sarno *et al.*, 2010; Salvemini *et al.*, 2010). Nas espécies desses gêneros, o gene *transformer* participa da sua auto-regulação e fornece o dispositivo de memória para a determinação do sexo. Em *Anastrepha*, de modo similar em *Bactrocera* e *Ceratitidis*, a proteína Tra funcional é produzida apenas em fêmeas. O gene *transformer-2* é necessário para o "splicing" específico do pré-RNA de *doublesex* e *transformer* de fêmeas, e portanto, participa na função de auto-regulação do *transformer* e na determinação do sexo (Sarno *et al.*, 2010). O gene *tra-2* é transcrito em machos e fêmeas, durante o desenvolvimento e na vida adulta, em linhagem somáticas e germinativas. A partir da injeção de dsRNA *transformer-2* de *Anastrepha obliqua* em embriões de *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* foi mostrado que o padrão de "splicing" endógeno do pre-mRNA de *transformer* e *doublesex* de fêmeas XX foi alterado, fazendo fêmeas desenvolverem características morfológicas de machos. Portanto, essas fêmeas são transformadas em pseudomachos XX. Foi observado também a presença de gônadas aberrantes nos pseudomachos tratados com dsRNA

de *transformer-2* (Sarno et al., 2010). A transformação de fêmeas em pseudomachos XX, assim como a presença de gônadas aberrantes, também foi demonstrada em *A. suspensa* a partir da injeção de dsRNA de *tra* e *tra-2* em embriões (Schetelig et al., 2012). A injeção de dsRNA de *tra-2* em embriões de *Ceratitis capitata* também provoca tal transformação. Curiosamente, a análise de RT-PCR demonstrou que o RNAm macho-específico de *fruitless* estava presente em todos os pseudomachos XX e moscas intersexuais XX. Além disso, esses pseudomachos XX exibiram comportamento sexual típico de machos XY. Esses dados sugerem que *fruitless* está sob o controle de *tra/tra-2* em *C. Capitata*, e que a causa da masculinização comportamental em pseudomachos XX pode estar relacionada a uma mudança na regulação sexo-específica de *fruitless* (Salvemini et al., 2009).

O gene *fruitless* foi caracterizado em Hymenoptera (*Apis mellifera* e *Nasonia vitripennis*), Orthoptera (gênero *Chorthippus*), Lepidoptera (*Bombyx mori*) e em vários grupos de Dipteros (Bertossa et al., 2009; Ustinova e Mayer, 2006). Em Diptera, o mosquito transmissor da malária, *Anopheles gambiae* (Culicidae), e várias espécies de Drosophilideos tiveram o gene *fru* caracterizado (Gailey et al., 2006; Davis et al., 2000a; Davis et al., 2000b). Na mosca-das-frutas *Ceratitis capitata*, o gene *fru* é regulado por "splicing" alternativo Salvemini et al. (2009).

O gene *fruitless* é altamente conservado em insetos, apresentando uma organização genômica bastante similar em Diptera (Salvemini et al., 2009). Em espécies de *Anastrepha*, este gene possui quatro promotores (P1, P2, P3 e P4) e quatro regiões estruturais: domínio sexo-específico (S), domínio BTB (dimerização), região de conexão e domínio de ligação com o DNA ou "zinc fingers" (ZnF) (Sobrinho e Brito, 2010). Em *Drosophila melanogaster*, transcritos produzidos a partir do Promotor 1 sofrem um "splicing" sexo-específico no éxon S que remove uma região fêmea-específica em machos, produzindo assim, a proteína funcional Fru^M. Em fêmeas esta região é mantida, e por possuir um "stop codon", produz uma proteína truncada. Os promotores P2, P3 e P4 produzem transcritos que estão presentes em ambos os sexos. Esses transcritos não contêm o éxon S, porém contêm as outras três regiões

estruturais deste gene. O produto protéico desses transcritos atuam em diferentes tecidos e/ou estágios de desenvolvimento, conferindo ao *fruitless* um padrão de expressão complexo (Anand *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2002).

Figura 2: Organização do gene *fruitless* (A) e seus transcritos (B). P1-P4: promotores alternativos. S: éxon que sofre "splicing" sexo-específico encontrado somente em transcritos P1. C1 e C2: Domínio BTB (Domínio de dimerização). C3, C4 e C5: Região de conexão. A, B, C e D: Zinc-fingers (Domínios de ligação ao DNA) (Demir e Dickson, 2005).

Um estudo envolvendo um fragmento de 802 pb que contém uma pequena parte do intron I3 e uma parte do primeiro éxon da região de conexão (éxon C3) do gene *fruitless* sugere que a alta diversificação da região de conexão de *fruitless*, em três espécies próximas de *Anastrepha* (*A. fraterculus*, *A. sororcula* e *A. obliqua*), é devido a seleção positiva (Sobrinho e Brito, 2010).

Apesar das alterações morfológicas e moleculares relatadas a partir do silenciamento gênico de *tra-2* no gênero *Anastrepha* (Sarno *et al.*, 2010), os mecanismos envolvendo o funcionamento do gene *fruitless* nesse gênero permanecem desconhecidos. Assim como o gene *fruitless*, o gene *period* permanece pouco estudado em espécies deste gênero. Assim, torna-se relevante avaliar as possíveis alterações comportamentais geradas por mudanças na expressão desses genes possivelmente relacionados ao

comportamento de acasalamento de moscas-da-fruta do complexo *Anastrepha fraterculus*.

O comportamento de corte e cópula das moscas-das-frutas é complexo e envolve uma série de sinalizações espécie-específicas. Devido à importância econômica deste grupo, o comportamento de corte e cópula têm sido alvo de muitos estudos visando o desenvolvimento de programas de controle populacional (Morgante *et al.*, 1983; Aluja *et al.*, 1999).

Duas estratégias de acasalamento em moscas-das-frutas foram descritas. Na estratégia mais simples, "estratégia tipo 1", os machos estabelecem territórios nas plantas hospedeiras e os defendem da ocupação por outros machos. Quando uma fêmea invade o território de um macho, este monta a fêmea forçando a cópula. A estratégia mais complexa, "estratégia tipo 2", envolve sistemas de sinalização mais elaborados. Nessa estratégia, os machos se agregam em uma formação semicircular (Leks) na folhagem das plantas. A partir de então, os machos utilizam atrativos olfativos (infoquímicos) de longa distância que são captados por quimiorreceptores nas antenas das fêmeas. Quando uma fêmea é atraída para uma Arena de Exibição ("Lek"), os machos exibem uma série de sinais sexuais que envolvem a realização de movimentos com as asas, dança e liberação de ferômonios, até que a fêmea faz a sua escolha (Sivinski *et al.*, 1999; Gomes-Cendra *et al.*, 2011).

Várias espécies de *Anastrepha* apresentam a estratégia 2 de comportamento de acasalamento, dentre as quais está a espécie nominal *Anastrepha fraterculus*. Esta espécie, também conhecida como "mosca-da-fruta Sul-americana", é a de grande importância econômica no Brasil (Zucchi, 2008). Encontra-se amplamente distribuída na Região Neotropical, ocorrendo desde o sul do Texas até o centro da Argentina e norte do Chile e ocupando ambientes bastante distintos (Foote *et al.*, 1993; Malavasi *et al.*, 2000; Hernández-Ortiz *et al.*, 2012).

Vários estudos populacionais com a espécie nominal *A. fraterculus* descreveram diferenças morfológicas, genéticas, cromossômicas e comportamentais entre populações coletadas em diferentes áreas da Região Neotropical mostrando que essa espécie nominal, na realidade, corresponde

a um complexo de espécies crípticas, cujas entidades estão sendo caracterizadas (Selivon *et al.*, 1999, 2004, 2005; Cáceres *et al.*, 2009; Hernández-Ortiz *et al.*, 2012, 2015).

Através da análise integrada de várias metodologias (isozimas, cromossomos, morfometria de asas e ovipositores, morfologia dos ovos, marcador molecular e compatibilidade reprodutiva) aplicadas em amostras de *A. fraterculus* s.l. de várias localidades, foi possível mostrar que no Brasil, existem pelo menos três grupos genéticos e morfológicos claramente distintos de *A. fraterculus*. Baseado nestes dados de características biológicas, os três morfotipos foram provisoriamente nomeadas como *A. sp.1 affinis fraterculus* (*A. sp.1*), *A. sp.2 aff. Fraterculus* (*A. sp.2*) e *A. sp.3 aff. Fraterculus* (*A. sp.3*) (Selivon, 1996; Selivon e Perondini, 1998; Selivon *et al.*, 1999, 2004, 2005; Goday *et al.*, 2006). Mais recentemente, análises morfométricas do mesonoto, acúleo e asas (Hernández-Ortiz *et al.*, 2012) e análise do marcador molecular ITS1 do DNA ribossômico (Prezotto, 2008), revelaram a existência de um morfotipo Mexicano/America Central, um morfotipo Venezuelano (baixas altitudes da Venezuela), um morfotipo Andino (Venezuela/Colombia), um morfotipo Peruano (baixas altitudes do Peru/ Equador) e um morfotipo Equatoriano (altas altitudes do Peru/ Equador) além dos três morfotipos brasileiros.

Análises demonstraram que existe incompatibilidade reprodutiva entre os morfotipos brasileiros *A. sp.1* e *A. sp.2* (Selivon *et al.*, 1999, 2005), entre os morfotipos do Peru, Argentina, Colômbia e Brasil (Vera *et al.*, 2006) e elevados níveis de isolamento pré-zigótico e pós-zigótico entre exemplares da Argentina e Peru (Cáceres *et al.*, 2009). Grande ênfase tem sido dada ao isolamento alocrônico como um importante fator de isolamento reprodutivo entre pares de espécies próximas de *Anastrepha* (Aluja *et al.*, 1999). Alocronia no comportamento de acasalamento já foi descrita para diversas entidades do complexo *fraterculus*, em *A.sp.1* e *A. sp.3* no Brasil (Selivon *et al.* em prep.), na Argentina e Peru (Vera *et al.*, 2006). Assim, o estudo de genes envolvidos no comportamento reprodutivo e no relógio biológico, como *fruitless* e *period*, seriam determinantes para a compreensão do processo de isolamento reprodutivo alocrônico dentro do complexo *A. fraterculus*, visto que

modificações nesses genes poderiam alterar o horário e o comportamento de cópula dos indivíduos, criando assim, barreiras pré-zigóticas.

2. Objetivos

Verificar as possíveis alterações comportamentais e reprodutivas geradas por silenciamento gênico de *fruitless* e *period* através da técnica de RNA interferente em *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus*.

Objetivos específicos:

1. Sintetizar RNA interferente de *fruitless* e *period* de *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus*.
2. Avaliar possíveis alterações no comportamento reprodutivo a partir do silenciamento de *fruitless* ou *period* em machos adultos de *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus*.
3. Avaliar possíveis alterações no comportamento reprodutivo da progênie de fêmeas de *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* injetadas com RNA interferente de *fruitless*.
4. Avaliar possíveis alterações no ciclo circadiano a partir do silenciamento de *fruitless* ou *period* em machos adultos de *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus*.
5. Verificar possíveis alterações na produção de espermatozoides em machos tratados com RNA interferente de *fruitless* e *period*.

3. Materiais e Métodos

3.1 Espécie

O presente estudo foi realizado com a mosca-das-frutas *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus* (Diptera, Tephritidae) derivadas de colônias mantidas no laboratório. Essas colônias originaram-se de exemplares coletados em goiaba (*Psidium guajaba*) em várias localidades do Vale do Rio Paraíba do Sul e em diferentes ocasiões. As colônias no laboratório foram mantidas em condições padronizadas de temperatura de 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), umidade de 60% e fotoperíodo de 12L:12E, de acordo com Selivon et al. (2005).

3.2 Amplificação de fragmentos dos genes *period* e *fruitless*

3.2.1 Extração de DNA genômico

Para a obtenção de DNA genômico de moscas-das-frutas com o objetivo de amplificar fragmentos dos genes *period* e *fruitless*, indivíduos de *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus* foram coletados das colônias do laboratório e congelados em nitrogênio líquido por 10 segundos. Os indivíduos foram então macerados em tubos de 1,5 ml contendo 50 μl de solução TNES [Tris-HCl 250mM (pH= 7,5), NaCl 2mM, EDTA 100mM, SDS 2,5%]. Após a maceração, foram adicionados mais 500 μl de solução TNES e agitados no vortex por 10 segundos. Foram então adicionados 5 μl de proteinase K a 20 mg/ml e a mistura agitada em vortex e incubada a 65°C por 40 minutos. Após, a mistura foi colocada no gelo e foi adicionado 3 μl de RNAase (Ribonuclease A, Sigma) a uma concentração final 4 mg/ml e então agitada por inversão. Posteriormente, a solução foi incubada em banho maria por 30 minutos a 37°C. Foi adicionado 200 μl de NaCl 5M, e então após ser agitada, a solução foi centrifugada a 15.000 g a 4°C por 6 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante transferido para outro tubo contendo 600 μl de isopropanol 100% e as amostras foram novamente centrifugadas a 15.000 g à temperatura

ambiente por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao precipitado 600 µl de etanol 70%, seguido de centrifugação a 15.000 g à temperatura ambiente por 6 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi seco em estufa a 37°C por 20 minutos e, então, ressuspensão em 30 µl de solução TE [Tris-HCl 10mM (pH= 8,0), EDTA-NaOH (pH=8,0 1mM)] por 8 horas na geladeira. As amostras foram armazenadas a -20°C. Alíquotas do DNA foram analisadas por eletroforese em géis de agarose a 1% em tampão TAE 1X contendo GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 1X. A eletroforese foi realizada em cubas horizontais contendo solução TAE 1X como tampão de corrida, por 30 minutos sob tensão elétrica de 60 V e corrente de 60 mA constantes, conforme recomendado por Sambrook *et al.* (1989). Imagens dos géis foram digitalizadas em digitalizadora (Vilber Lourmat) acoplada a um transiluminador UV. As imagens dos géis foram transferidas para computador para análise. Após confirmada a presença de DNA genômico não degradado nas amostras, o material pode, então, ser utilizado para amplificação por PCR.

3.2.2 Amplificação e sequenciamento de fragmentos do gene *fruitless*

Foram desenhados iniciadores a partir da sequência (787 pb) publicada no banco de dados por Sobrinho e Brito, sob o código HQ003810. Os iniciadores desenvolvidos estão descritos abaixo:

Fru-F2 5'-GTGATCAACAGCTACGTGGT

Fru-R2 5'-GCATGAGTTCATCACGACTGTC.

O programa desenvolvido consistiu em iniciar a 94° C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos em 94° C por 1 minuto, 47° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto. Ao final, 72° C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram sequenciados após uma prévia purificação, utilizando o kit de purificação de DNA de gel (Eppendorf), segundo protocolo do fabricante. Os sequenciamentos foram realizados no Instituto de Química da USP, em um sequenciador automático ABI Prism Big Dye Terminator Cycles Sequencing,

utilizando-se o Ready Reaction Kit, seguindo as instruções do fabricante. As sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0.

3.2.3 Amplificação e sequenciamento de fragmento do gene *period*

Os iniciadores foram desenhados utilizando-se a sequência AY065665.2 do banco de dados do NCBI correspondente a uma região codificante do gene *period* de *Anastrepha suspensa*. Os iniciadores desenvolvidos foram:

PER-F 5' CGAATATGGCACCTTCGGAT

PER-R1 5' ATTGACTTGGTGTCTGCCTTGCA

O programa desenvolvido consistiu em iniciar a 94° C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos em 94° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto. Ao final, 72° C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram sequenciados após uma prévia purificação, utilizando o kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Os sequenciamentos foram realizados no Instituto de Química da USP em um sequenciador automático ABI Prism Big Dye Terminator Cycles Sequencing, utilizando-se Ready Reaction Kit, segundo as instruções do fabricante. As sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0.

3.3 Síntese do dsRNA de *fruitless* e de *period*

3.3.1 Extração de RNA total

O primeiro passo para a produção de dsRNA é a extração de RNA total de moscas visando a produção de cDNA dos genes que serão silenciados. Como *period* é um gene de comportamento e expresso principalmente na cabeça das moscas (Siwicki *et al.*, 1988, Hardin *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1992), o RNAm desse gene ocorre em baixa concentração no RNA total extraído de moscas inteiras. Assim, para o gene *period*, o RNA total foi extraído de 15 cabeças de machos adultos com sete dias após a emergência. Para o gene *fruitless*, o RNA total foi extraído de cinco machos adultos com sete dias após

a emergência. Para ambos genes, as moscas ou as cabeças dissecadas, foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas em um tubo de 1,5ml. Foi então adicionado 1 ml de TRIzol® Reagent e 10µl 2-Mercaptoethanol neste mesmo tubo. A solução foi misturada, deixada à temperatura ambiente por 5 minutos e então centrifugada por 10 minutos em velocidade máxima à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml. Para cada 1 ml dessa solução, foi adicionado 400 µl de clorofórmio. A solução foi misturada no agitador de tubos vortex para misturar as fases e então deixada descansando por 3 minutos para separar as fases. A solução foi centrifugada por 5 minutos à velocidade máxima e 600 µl do sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foi adicionado 600 µl de isopropanol 100% para precipitar o RNA e a solução foi misturada no agitador por 10 segundos. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi posto para secar. Foi adicionado 600 µl de etanol 70% e a solução foi agitada por 10 segundos no agitador para ressuspender o pellet, e então centrifugada por 2 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi posto para secar. Este passo de lavagem com etanol 70% foi feito uma segunda vez. O pellet foi deixado secando até ficar transparente (cerca de 15 minutos à temperatura ambiente). Por fim, o pellet foi ressuscitado em 200 µl de H₂O destilada (MilliQ) e testado em gel de agarose 1%. A concentração de RNA total foi medida em aparelho NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Uma extração bem sucedida gerava em torno de 40 µg de RNA total.

3.3.2 Síntese do dsRNA de *fruitless*

O kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen™) foi utilizado para produzir fragmentos de cDNA de *fruitless* a partir do RNA total (5 µg por reação) utilizando o iniciador Fru-F2. A seguir, estes fragmentos foram amplificados por PCR com o par de iniciadores:

Fru-F2 5'-GTGATCAACAGCTACGTGGT

Fru-R2 5'-GCATGAGTTCAT CACGACTGTC

O programa desenvolvido consiste em iniciar a 94° C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos em 94° C por 1 minuto, 47° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto. Ao final, 72° C por 10 minutos. Esses fragmentos foram purificados utilizando o kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) para isolamento da banda de interesse. Estes fragmentos purificados foram sequenciados. Os sequenciamentos foram realizados no Instituto de Química da USP, utilizando-se o sequenciador automático ABI Prism Big Dye Terminator Cycles Sequencing Ready Reaction Kit, seguindo as instruções do fabricante. As sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0.

Estes fragmentos purificados foram então utilizados em um segundo PCR utilizando os mesmos iniciadores, porém, contendo a sequência de nucleotídeos do promotor T7 na porção 5' de cada iniciador:

T7Fru-F2 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGTGATCAACAGCTACGTGGT

T7Fru-R2 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGCATGAGTTCATCACGACTGTC

O programa utilizado consistiu em iniciar a 94° C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos em 94° C por 1 minuto, 65° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto. Ao final, 72° C por 10 minutos. Alíquotas desse segundo PCR foram analisadas por eletroforese em géis de agarose a 1% em tampão TAE 1X contendo GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 1X. A eletroforese foi realizada em cubas horizontais contendo solução TAE 1X como tampão de corrida, por 30 minutos sob tensão elétrica de 60 V e corrente de 60 mA constantes, conforme recomendado por Sambrook *et al.* (1989). Os géis foram analisados em um transiluminador UV e imagens foram digitalizadas em um visualizador da Vilber Lourmat e as imagens transferidas para computador para análise. Após confirmada a presença do fragmento, a concentração de DNA foi medida utilizando o aparelho NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). O produto de amplificação obtido foi utilizado para a síntese de dsRNA.

Cerca de 1 µg do DNA amplificado foi utilizado como molde para produzir o dsRNA de *fruitless* numa reação de transcrição *in vitro* por 16 horas com RNA polimerase de T7 usando o kit Megascript (Ambion). Este dsRNA foi

purificado utilizando o protocolo de precipitação em Cloreto de Lítio (LiCl) descrito no kit Megascript, e então, ressuspensão em 50 µl de tampão de injeção (5mM KCl, 0,1 mM NaH₂PO₄, pH 6,8). A concentração de dsRNA foi medida utilizando o aparelho NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Ao final, são obtidos cerca de 100 µg de dsRNA diluídos em uma solução contendo cerca de 2 µg/µl de dsRNA de *fruitless*.

Alíquotas de dsRNA de *fruitless* foram analisadas por eletroforese em géis de agarose a 1% em tampão TAE 1X contendo GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 1X. A eletroforese foi realizada em cubas horizontais contendo solução TAE 1X como tampão de corrida, por 30 minutos sob tensão elétrica de 60 V e corrente de 60 mA constantes. Os géis foram analisados em um transiluminador UV e imagens foram digitalizadas em um visualizador da Vilber Lourmat e as imagens transferidas para computador para análise.

3.3.3 Síntese do dsRNA de *period*

O kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen™) foi utilizado para produzir fragmentos de cDNA de *period* a partir do RNA total (5 µg por reação) utilizando o iniciador Per-R1. A seguir, o produto dessa reação foi amplificado em um PCR contendo o par de iniciadores:

PER-F 5' CGAATATGGCACCTTCGGAT

PER-R1 5' ATTGACTTGGTGTGCGCCTTGCA

O programa desenvolvido consiste em iniciar a 94° C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos em 94° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto. Ao final, 72° C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram sequenciados após uma prévia purificação. Esses fragmentos foram purificados utilizando o kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Os sequenciamentos foram realizados no Instituto de Química utilizando-se o sequenciador automático ABI Prism Big Dye Terminator Cycles Sequencing Ready Reaction Kit, seguindo as instruções do fabricante. As sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0.

Estes fragmentos purificados foram então utilizados em um segundo PCR utilizando os mesmos iniciadores, porém, contendo a sequência de nucleotídeos do promotor T7 na porção 5' de cada iniciador:

T7PER-F 5' TAATACGACTCACTATAGGGACGAATATGGCACCTTCGGAT

T7PER-R1 5' TAATACGACTCACTATAGGGAATTGACTTGGTGTCTCGCCTTGCA

O programa desenvolvido consiste em iniciar a 94° C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos em 94° C por 1 minuto, 65° C por 1 minuto e 72° C por 40 segundos. Ao final, 72° C por 10 minutos. Alíquotas desse segundo PCR foram analisadas por eletroforese em géis de agarose a 1% em tampão TAE 1X contendo GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 1X. A eletroforese foi realizada em cubas horizontais contendo solução TAE 1X como tampão de corrida, por 30 minutos sob tensão elétrica de 60 V e corrente de 60 mA constantes, conforme recomendado por Sambrook *et al.* (1989). Os géis foram analisados em um transiluminador UV e imagens foram digitalizadas em um visualizador da Vilber Lourmat e as imagens transferidas para computador para análise, a concentração de DNA foi medida utilizando o aparelho NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). O produto de amplificação obtido foi utilizado para a síntese de dsRNA.

Cerca de 1 µg do DNA amplificado foi utilizado como molde para produzir o dsRNA de *period* numa reação de transcrição *in vitro* por 16 horas com RNA polimerase de T7 usando o kit Megascript (Ambion). Este dsRNA foi purificado utilizando o protocolo de precipitação em Cloreto de Lítio (LiCl) descrito no kit Megascript, e então, ressuspenso em 50 µl de tampão de injeção (5mM KCl, 0,1 mM NaH₂PO₄, pH 6,8). A concentração de dsRNA foi medida utilizando o aparelho NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Ao final, são obtidos cerca de 100 µg de dsRNA diluídos em uma solução contendo cerca de 2 µg/µl de dsRNA de *period*.

Alíquotas de dsRNA de *period* foram analisadas por eletroforese em géis de agarose a 1% em tampão TAE 1X contendo GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 1X. A eletroforese foi realizada em cubas horizontais contendo solução TAE 1X como tampão de corrida, por 30 minutos sob tensão elétrica de 60 V e corrente de 60 mA constantes. Os géis foram analisados em um

transiluminador UV e imagens foram digitalizadas em um visualizador da Vilber Lourmat e as imagens transferidas para computador para análise.

3.4 RT-PCR para avaliar o silenciamento de *period* e *fruitless*

Para averiguar os níveis de silenciamento causado pelos dsRNAs que foram produzidos no nosso laboratório, um protocolo de RT-PCR foi adaptado a partir do kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen™) para verificar a expressão gênica dos genes alvo desse estudo.

Assim, machos adultos de *A. sp.1 aff. fraterculus* foram injetados no abdômen com 1,5 µg de dsRNA de *period* ou *fruitless* e então, o RNA total de cada indivíduo isoladamente foi extraído em diferentes dias após a injeção. RNA total também foi extraído de machos adultos não injetados. Para extração do RNA, cada macho foi congelado em nitrogênio líquido e macerado em um tubo de 1,5ml. Foi então adicionado 1 ml de TRIzol® Reagent e 10µl 2-Mercaptoethanol neste mesmo tubo. A solução foi misturada, deixada à temperatura ambiente por 5 minutos e então centrifugada por 10 minutos em velocidade máxima à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml. Para cada 1 ml dessa solução, foi adicionado 400 µl de clorofórmio. A solução foi misturada no agitador de tubos vortex para misturar as fases e então deixada descansando por 3 minutos para separar as fases. A solução foi centrifugada por 5 minutos à velocidade máxima e 600 µl do sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foi adicionado 600 µl de isopropanol 100% para precipitar o RNA e a solução foi misturada no agitador por 10 segundos. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 10000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi posto para secar. Foi adicionado 600 µl de etanol 70% e a solução foi agitada por 10 segundos no agitador para ressuspender o pellet, e então centrifugada por 2 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi posto para secar. Este passo de lavagem com etanol 70% foi feito uma segunda vez. O pellet foi deixado secando até ficar transparente (cerca de 15 minutos à temperatura ambiente). Por fim, o pellet foi ressuspensionado em 40

μl de H₂O destilada e testado em gel de agarose 1%. A concentração de RNA total foi medida em aparelho NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). O RNA total desses machos foi utilizado para amplificação dos fragmentos de DNA de *fruitless* e de *period* a fim de avaliar a expressão gênica.

3.4.1 Amplificação de fragmentos de DNA de *fruitless* e *period*

O RNA total de moscas não injetadas e de moscas injetadas com dsRNA de *fruitless* e/ou de *period* foi utilizado em uma reação (4 μg de RNA total por reação) de síntese de cDNA do fragmento dos genes. Para essas reações, foi utilizado o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen™).

Para o gene *fruitless* foi utilizado o iniciador Fru-F2. A seguir, o produto dessas reações foi amplificado em um PCR contendo o par de iniciadores Fru-F2/Fru-R2. O programa desenvolvido consiste em iniciar a 94° C por 3 minutos, seguido de 32 ciclos em 94° C por 1 minuto, 47° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto. Ao final, 72° C por 10 minutos.

Para o gene *period* foi utilizado o iniciador Per-F. A seguir, o produto dessas reações foi amplificado em um PCR contendo o par de iniciadores Per-F/Per-R1. O programa desenvolvido consiste em iniciar a 94° C por 3 minutos, seguido de 32 ciclos em 94° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto. Ao final, 72° C por 10 minutos.

Alíquotas dos produtos das PCR foram analisadas por eletroforese em géis de agarose a 1% em tampão TAE 1X contendo GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 1X. A eletroforese foi realizada em cubas horizontais contendo solução TAE 1X como tampão de corrida, por 30 minutos sob tensão elétrica de 60 V e corrente de 60 mA constantes, conforme recomendado por Sambrook *et al.* (1989). Os géis foram analisados em um transiluminador UV e imagens foram digitalizadas em um visualizador da Vilber Lourmat e as imagens transferidas para computador para análise.

3.5 Teste do método de injeção para silenciamento gênico

O silenciamento dos genes *fruitless* e *period* foram feitos pela injeção dos dsRNAs respectivos, no abdômen de machos e/ou fêmeas de *Anastrepha sp.1 affinis fraterculus*, com uma solução dos dsRNAs em tampão de injeção (5mM KCl, 0,1 mM NaH₂PO₄, pH 6,8). Assim, foi testado, primeiramente, o próprio método de injeção com agulhas da Eppendorf (Femtotips®) e a seguir, se a injeção do tampão de injeção puro (sem os dsRNAs) causaria algum efeito nos indivíduos injetados. Para tanto, 30 machos foram injetados com 1 µL do tampão e os machos foram analisados após uma semana, em comparação à outro grupo de 30 machos que não foram injetados (controle geral). Foi anotado o número de machos realizando atividades durante 15 minutos, a cada hora, durante 24h. Os resultados mostraram que ocorreram pequenas diferenças entre as duas distribuições, mas o teste não paramétrico de Willcoxon (T = 29,00; Z= 1,475; p = 0,141) demonstrou não haver diferenças estatísticas entre elas. Deste modo, nos testes que se seguiram, os dados de machos injetados com dsRNAs foram comparados a controles (sem injeção) específicos para cada teste.

3.6 Silenciamento do gene *fruitless*

Nas descrições das metodologias empregadas o número de indivíduos analisados em cada teste será apresentado em Resultados para maior clareza.

3.6.1 Silenciamento de *fruitless*: atividade dos machos

Machos adultos virgens de *A. sp.1 aff. fraterculus* com 14 dias após a emergência foram injetados no abdômen com 1,5 µg de dsRNA de *fruitless*. Decorridos mais 7 dias, machos foram realocados individualmente para tubos cilíndricos de fundo cônico. Em seguida, uma fêmea virgem, com a mesma idade, foi introduzida em cada tubo. Ao amanhecer do dia seguinte foram

registradas qualquer atividade exercida pelos machos, tais como: deslocamento, bater de asas, rodopio e busca de alimento. A cada hora, durante 15 minutos, os machos foram observados e os seus comportamentos foram registrados. As observações ocorreram durante toda a fotofase (06:00 – 18:00) e uma parte da escotofase (18:00 – 21:00). Machos não injetados (controles), com a mesma idade também foram observados nas mesmas condições.

3.6.2 Silenciamento de *fruitless*: comportamento reprodutivo de machos

Machos adultos virgens de *A. sp.1 aff. fraterculus* com 14 dias após a emergência foram injetados no abdômen com 1,5 µg de dsRNA de *fruitless*. Decorridos mais 7 dias, machos foram realocados individualmente para tubos cilíndricos de fundo cônico. Em seguida, uma fêmea virgem, com a mesma idade, foi introduzida em cada tubo. Ao amanhecer do dia seguinte, a cada hora, durante 15 minutos, os machos foram observados e os seus comportamentos reprodutivos foram registrados: batimento das asas (emissão de sinais acústicos), protrusão do último segmento abdominal (para liberação de feromônios produzidos pelas glândulas abdominais) (Sivinski e Burk, 1989) e cópula, quando o macho insere o edeago no ovipositor da fêmea (Sugayama e Malavasi, 2000). As observações ocorreram durante o período da manhã (06:00 – 12:00), em que há o maior índice de cópulas nessa espécie (Selivon et al., 2005; Vera et al., 2006). Machos não injetados (controles), com a mesma idade também foram observados nas mesmas condições.

3.6.3 Silenciamento de *fruitless* por RNAi parental

Com o objetivo de produzir proles com o gene *fruitless* silenciado, 1,5 µg de dsRNA de *fruitless* foi injetado no abdômen de fêmeas adultas virgens de *A. sp.1 aff. fraterculus*, com 20 dias após a emergência. Como controles, fêmeas não injetadas do estoque foram isoladas. Todas as fêmeas, dos dois conjuntos, foram colocadas em gaiolas separadas e então, cruzadas com

machos virgens do estoque. Em cada uma das gaiolas foi fornecido um mamão para a oviposição. Após uma semana na caixa, cada mamão era colocado em frascos contendo vermiculita e mantidos a 25° C, por 24 dias, para a obtenção de pupas. As pupas foram separadas e colocadas em caixas de população até a emergência dos adultos. Os machos adultos F1 que emergiram das condições experimentais, foram mantidos isolados até atingirem a maturidade sexual. Passados 21 dias da emergência, machos das duas condições experimentais foram colocados em recipientes de vidro (15x10x15 cm) separados. Em seguida, foram adicionadas a cada um desses recipientes, fêmeas virgens do estoque com a mesma idade. Esses casais foram, então, observados quanto a comportamento de cópula. A observação do comportamento foi feita durante o período da manhã (6-12h).

3.7 Silenciamento do gene *period*

Nas descrições das metodologias empregadas o número de indivíduos analisados em cada teste será apresentado em Resultados para maior clareza.

3.7.1 Silenciamento de *period*: atividade dos machos

Machos adultos virgens de *A. sp.1 aff. fraterculus* com 14 dias após a emergência foram injetados no abdômen com 1,5 µg de dsRNA de *fruitless*. Decorridos mais 7 dias, machos foram realocados individualmente para tubos cilíndricos de fundo cônico. Em seguida, uma fêmea virgem, com a mesma idade, foi introduzida em cada tubo. Ao amanhecer do dia seguinte foi registrada qualquer atividade exercida pelos machos, tais como: deslocamento, bater de asas, rodopio e busca de alimento. A cada hora, durante 15 minutos, os machos foram observados e os seus comportamentos foram registrados. As observações ocorreram durante a fotofase (06:00 – 18:00) e escotofase (18:00 – 06:00), completando assim, 24h de observação,

que corresponde a um ciclo circadiano Machos não injetados (controles), com a mesma idade também foram observados nas mesmas condições.

3.7.2 Silenciamento de *period*: comportamento reprodutivo de machos

Machos adultos virgens de *A. sp.1 aff. fraterculus* com 14 dias após a emergência foram injetados no abdômen com 1,5 µg de dsRNA de *period*. Foram feitos dois experimentos com machos, sete dias após a injeção:

Exp.1: 10 machos foram transferidos para uma caixa de plástico juntamente com fêmeas virgens não injetadas com a mesma idade. Em outra caixa, foram colocados machos do estoque, com 21 dias e fêmeas virgens com mesma idade. As caixas continham água e alimento para as moscas. Esses casais foram, então, observados quanto a comportamento reprodutivo. A observação do comportamento foi feita durante o período da manhã (6-12h).

Exp.2: machos foram realocados individualmente para tubos cilíndricos de fundo cônico que continha uma porção de alimento. Em seguida, uma fêmea virgem, com a mesma idade, foi introduzida em cada tubo. Ao amanhecer do dia seguinte, a cada hora, durante 15 minutos, os machos foram observados e os seus comportamentos reprodutivos foram registrados. As observações ocorreram durante a fotofase e escotofase (06:00 – 06:00). Machos não injetados (controles), com a mesma idade também foram observados nas mesmas condições.

3.8 Silenciamento de *fruitless* e *period* em machos adultos: produção de espermatozóides

A análise da produção de espermatozóides foi feita segundo o protocolo descrito por Snook *et al.* (2000) para *Drosophila simulans*, com pequenas modificações feitas para *Anastrepha* (Prezotto, 2013). Os dados foram obtidos a partir da contagem do número de cistos em um determinado

estágio da espermiogênese. Os estágios da espermiogênese, de cada cisto, foram identificados em uma preparação de testículos por leve esmagamento entre lâmina e lamínula. Assim, essa contagem fornece um índice relativo confiável da produção de espermatozóides. Esse método foi utilizado para análise da produção de espermatozóides pelos machos injetados com o dsRNA de *fruitless* ou dsRNA de *period*. Os dsRNAs foram injetados em machos com um dia após a emergência e, a seguir, dois deles a intervalos de aproximadamente cinco dias, foram dissecados e os testículos analisados quanto à produção de espermatozóides. Os testículos foram ligeiramente esmagados entre lâmina e lamínula, a lamínula retirada por congelamento em N₂ líquido, as preparações fixadas em metanol a -10° C por 15 min, secas ao ar, e coradas pelo DAPI (0,5 µg/ml em tampão fosfato) ou então pelo Giemsa (5% em tampão fosfato, pH 6,8). As preparações foram montadas em solução de tampão:glicerina com n-propilgalato para a coloração por DAPI ou com bálsamo do Canadá, para a coloração pelo Giemsa e examinadas em microscópio de fluorescência (coradas pelo DAPI) ou em microscopia de luz quando coradas pelo Giemsa, em um microscópio Olympus BX60. Os cistos, em determinado estágio da espermiogênese, foram então contados (Figura 3).

Figura 3: Estágio de alongamento das espermátide nos cistos em espermiogênese (A,B). Em A, a preparação foi corada pelo DAPI e a seta indica os núcleos das espermátides juxtapostos e o cisto alongando-se. (B) Mostra um cisto em espermiogênese corado pelo Giemsa. (C) mostra uma área da preparação corada pelo Giemsa na qual se pode contar o número de cistos neste estágio da espermiogênese.

3.9 Análise de dados

Comportamentos registrados entre dados dos controles e dos tratamentos com os dsRNAs, serão comparados considerando-se a hora do dia como um fator. Embora nesses casos as distribuições sejam circulares, os pontos angulares das duas distribuições, controle e tratamentos, são exatamente correspondentes. Deste modo, as comparações serão feitas pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon para dados emparelhados considerando $\alpha=0,05$ (Zar, 1999). Nas análises cujos dados são proporções, as análises serão feitas por Qui-quadrado em Tabelas de Contingência. Todas as análises serão feitas a partir do programa Statistica® 6.0 (StatSoft, Inc.).

4. Resultados

4.1 Amplificação e sequenciamento de fragmentos dos genes *fruitless* e *period*

4.1.1 Amplificação de fragmento de *fruitless*

Após a extração do DNA genômico, o mesmo foi utilizado em um PCR de *fruitless*, como descrito nos materiais e métodos. O PCR gerou fragmentos dupla-fita de DNA de aproximadamente 500 pb (Figura 4).

Figura 4: Fragmentos de *fruitless* amplificados pelos iniciadores Fru-F2 e Fru-R2. Marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix. 1 a 4: Machos adultos de *A. sp.1 aff. fraterculus*; 5 a 8: Fêmeas adultas de *A. sp.1 aff. fraterculus*.

O produto destas PCR foram sequenciados e analisados, gerando uma sequência consenso de 334 pb. A sequência foi comparada com a sequência HQ003810.1 do banco de dados que corresponde ao Éxon C3 do gene *fruitless* de *A. fraterculus s.l.* com 99% de identidade, como mostrado abaixo:

Anastrepha fraterculus haplotype 21 fruitless (fru) gene, exon C3 and partial cds
Sequence ID: HQ003810.1; Length: 787; 99% of identity.

Query	1	GTGGTCGTGCCACCGAACGCGAACTACGCGACGATTTGCATGCACATCGCAGCAGCAGTC	60
Sbjct	231	GTGGTCGTGCCACCGAACGCGAACTACGCGACGATTTGCATGCACATCGCAGCAGCAGTC	290
Query	61	TTCCGGACCGAAATGCCGTGCGAGCTGCTACTGCCAGTGTGGGTAGTGTGAGTGCCAGTT	120
Sbjct	291	TTCCGGACCGAAATGCCGTGCGAGCTGCTACTGCCAGTGTGGGTAGTGTGAGTGCCAGTT	350
Query	121	TACAATCCGCCGCGAGTAGCTTTGGGTTTGGGCGAACGTTACCGATTACAGCGGCCGCAA	180
Sbjct	351	TACAATCCGCCGCGAGTAGCTTTGGGTTTGGGCGAACGTTACCGATTACAGCGGCCGCAA	410
Query	181	TGGCTGCTGCAGTGGCGGCTGCGGCTACACGTAGCGCCAGCGCTGATGCGCTAGGCGGTT	240
Sbjct	411	TGGCTGCTGCAGTGGCGGCTGCGGCTACACGTAGCGCCAGCGCTGATGCGCTAGGCGGTT	470
Query	241	CGACGAATACAGGCTGCACCGGTAGCGGTAGTACCGTTGGTGGTGGAGTGCTAAATAGTC	300
Sbjct	471	CGACGAATACAGGCTGCACCGGAAGCGGTAGTACCGTTGGTGGTGGAGTGCTAAATAGTC	530


```

Query  301  GCAATAGTGATGCGAATAGTGAGCGTGGAGGCGG  334
      |||
Sbjct  531  GCAATAGTGATGCGAATAGTGAGCGTGGTGGCGG  564

```

Estes dados, portanto, mostram que o fragmento, produzido pelos nossos iniciadores *A. sp.1 aff. fraterculus*, corresponde a um fragmento interno do gene *fruitless*.

4.1.2 Amplificação de fragmento de *period*

Após a extração do DNA genômico, o mesmo foi utilizado em uma PCR de *period*, como descrito em Materiais e Métodos. A PCR gerou fragmentos dupla-fita de DNA de quase 300 pb (Figura 5). Este resultado coincide com o esperado de uma reação utilizando-se esses dois iniciadores. Os iniciadores foram desenhados utilizando-se a sequência AY065665.2 do banco de dados correspondente a uma região codificante do gene *period* de *Anastrepha suspensa*. Partindo dessa sequência, os iniciadores Per-F e Per-R1 produziram um fragmento de 271 pb correspondente a uma região codificante altamente conservada denominada C6 (Colot *et al.*, 1988).

Figura 5: Fragmento de *period* amplificado a partir de macho adulto de *A. sp.1 aff. fraterculus* pelos iniciadores Per-F e Per-R1. Marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Os fragmentos amplificados foram sequenciados. Foram analisados os fragmentos amplificados mostrados na Figura 5, que foram obtidos a partir de RNA total de *A. sp.1*. Estes geraram uma sequência consenso de 165 nucleotídeos que foi comparado com o banco de dados, dando uma identidade de 98% com a sequência AY065665.2, de *Anastrepha suspensa*, como mostrado abaixo:

Anastrepha suspensa PERIOD mRNA, partial cds

Sequence ID: gb|AY065665.2|AH011305S2; Length: 1371; 98% of identity.

```

Query 1      CCATCGGTTGTTGGCGATTACGTTTCGGATCAACACAATCCAAATGATCTGAAGCCCAAT 60
          |||
Sbjct 832     CCATCGGTTGTTGGCGATTATGTTTCGGATCAACACAATCCGAATGATCTGAAGCCCAAT 891

Query 61     ACAGACAGCAACGGAACAGCGACGACATGGATGGTTCCAGTTTCTCGTCTTTCTACTCA 120
          |||
Sbjct 892     ACAGACAGCAATGGAACAGCGACGACATGGATGGTTCCAGTTTCTCGTCTTTCTACTCA 951

Query 121    TCTTTTATAAAAAACAACCGATGGATCGGATAGCCCGCAAGAAAAC 165
          |||
Sbjct 952     TCTTTTATAAAAACTACCGATGGATCGGATAGCCCGCAAGAAAAC 996

```

O fragmento obtido de *A. sp.1 aff. fraterculus*, correspondeu à uma região interna do gene *period*.

4.2 Síntese de dsRNA de *period* e *fruitless*

Para a síntese de dsRNA de *fruitless*, o RNA total foi extraído e utilizado em duas PCRs de *fruitless*, como descrito nos Materiais e Métodos. O primeiro PCR utilizou os iniciadores FRU-F2 e FRU-R2. Os produtos desta PCR foram purificados e então utilizados em uma segunda PCR utilizando os mesmos iniciadores, porém, contendo a sequência de nucleotídeos do promotor T7 na porção 5' de cada iniciador, gerando fragmentos de aproximadamente 500 pb nas amostras (Figura 6).

Figura 6: Fragmentos de T7 *fruitless* amplificados pelos iniciadores T7Fru-F2 e T7 Fru-R2. Marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix. 1 e 2: Machos adultos de *A. sp.1 aff. fraterculus*; 3 e 4: Fêmeas adultas de *A. sp.1 aff. fraterculus*.

De modo similar, os fragmentos purificados do gene *period* foram então utilizados em outra PCR com os iniciadores PER-F e PER-R1, porém, contendo

a sequência de nucleotídeos do promotor T7 na porção 5' de cada iniciador que gerou fragmentos de pouco mais de 300 pb (Figura 7).

Figura 7: Fragmento de *T7 period* amplificado a partir de macho adulto de *A. sp.1 aff. fraterculus* pelos iniciadores T7Per-F e T7 Per-R1. Marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Os fragmentos de DNA amplificados utilizando os iniciadores de *fru* e *per* contendo a sequência de nucleotídeos do promotor T7 na porção 5' de cada iniciador, foi utilizado como molde para produzir o dsRNA de *fruitless* e *period*. Os dsRNA estão mostrados na Figura 8. A figura demonstra que a quantidade de dsRNA produzida pelo kit Megascript T7 é muito alta, gerando bandas muito fortes quando examinadas em géis de agarose.

Figura 8: fragmentos de dsRNA produzidos pelo kit Megascript T7 da Ambion. 1: dsRNA de *period*. 2: dsRNA de *fruitless*. Marcador GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder Mix.

4.3. Silenciamento dos genes *fruitless* e *period*

Para averiguar os níveis de silenciamento causado pelos dsRNAs que foram produzidos no nosso laboratório, machos adultos de *A. sp.1 aff. fraterculus* foram injetados no abdômen com 1,5 µg de dsRNA de *period* e outros com o dsRNA de *fruitless*. RNA total de cada indivíduo, isoladamente, foi extraído em diferentes dias após a injeção e a amplificação por RT-PCR

feita como atrás descrito. Ao comparar os diferentes tempos após a injeção, nota-se que a quantidade de DNA amplificado pelo RT-PCR diminui ao longo do tempo de exposição de indivíduos de *A. sp.1 aff. fraterculus* ao dsRNA. Além disso, mostra que com apenas dois dias de tratamento o silenciamento ainda não pôde ser observado e com oito dias, o silenciamento atingiu níveis máximos (Figura 9 e 10).

Figura 9. RT-PCR de fragmento de *period* obtido a partir de RNA total de *A. sp.1 aff. fraterculus* injetadas com dsRNA de *period*. Iniciadores utilizados: Per-F e Per-R1. Tempo de exposição ao dsRNA de *period* em diferentes indivíduos: NT: Não tratado. 2: 2 dias. 6: 6 dias. 8: 8 dias. Marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Figura 10. RT-PCR de fragmento de *fruitless* obtido a partir de RNA total de *A. sp.1 aff. fraterculus* injetadas com dsRNA de *fruitless*. Iniciadores utilizados: FRU-F2 e FRU-R2. Tempo de exposição ao dsRNA de *fruitless* em diferentes indivíduos: NT: Não tratados. 2: 2 dias. 8: 8 dias. Marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Para verificar se algum produto foi amplificado após oito dias de exposição (F e G, Figura 9), porém em baixas quantidades, um novo PCR foi feito com o produto da primeira reação de PCR do indivíduo G, da figura 9, sob as mesmas condições que o primeiro PCR de *period*. Alíquotas desse PCR foram analisadas por eletroforese em géis de agarose a 1% em tampão TAE

1X contendo GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 1X. Novamente não foi observada bandas de DNA (Figura 11). Esses dados indicam que não há fragmentos de DNA de *period* após oito dias de injeção de dsRNA de *period*, sugerindo fortemente que o gene foi silenciado.

Figura 11: (A) PCR a partir do produto de um RT-PCR de um indivíduo de *A. sp.1 aff. fraterculus* após oito dias de injeção de dsRNA de *period* e (B) de um indivíduo não tratado pelo dsRNA. Iniciadores utilizados: Per-F e Per-R1. Marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

4.4 Silenciamento gênico de *fruitless* no comportamento de machos

Genes de comportamento podem atuar de diferentes maneiras. O gene *fruitless*, por exemplo, é traduzido em machos para produzir a proteína Fru^M em pequenos grupos de neurônios, onde atua em um circuito neural dedicado ao comportamento de corte de machos (Ito *et al.*, 1996; Ryner *et al.*, 1996; Manoli *et al.*, 2005; Usui-Aoki *et al.*, 2000). Embora o mesmo circuito esteja presente nas fêmeas, Fru^M exerceria o seu efeito através da modulação de sua função, e não na montagem deste circuito. O período crítico para Fru^M modular a função deste circuito, parece ocorrer durante o desenvolvimento, pois machos adultos começam a exibir o comportamento de corte logo após a emergência, sem qualquer exposição prévia a outros machos. Além disso, experimentos envolvendo a expressão condicional do gene *transformer* em *Drosophila*, sugeriram que o comportamento dos machos é irreversivelmente programado no estágio de pupa (Arthur *et al.*, 1998), período que coincide com o início da síntese de Fru^M em um crescente número de neurônios no sistema nervoso dos machos (Lee *et al.*, 2000).

Dessa forma, resolvemos testar se o funcionamento do circuito neural de machos e do gene *fruitless* depende da sua expressão constante nos adultos, pois existem trabalhos conflitantes na literatura quanto à participação do gene no comportamento dos machos de *Drosophila*: o gene *fruitless* atua na formação e no funcionamento do circuito nervoso dos machos ou apenas no funcionamento desse circuito (Arthur *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000). Além disso, foi testada a possibilidade de alterações na atividade das moscas silenciadas com dsRNA de *fruitless*, dado este que não está documentado na literatura. O método de silenciamento consiste em injetar dsRNA no abdômen de indivíduos adultos. Este método de silenciamento gênico nos indivíduos adultos, havia sido desenvolvido por Dzitoyeva *et al.* (2001) para *D. melanogaster* mostrando que a injeção de RNAi de um gene no abdômen, pode induzir alterações na expressão do gene no SNC do inseto.

O comportamento de machos tratados pelo dsRNA do gene *fruitless* foi analisado sob dois aspectos, quanto a atividade desses machos e quanto ao comportamento reprodutivo que apresentaram quando foi oferecido fêmeas virgens para acasalamento, como descrito no item 3.6.1 de Material e Métodos. Para tanto, 23 machos adultos virgens de *A. sp.1 aff. fraterculus* foram injetados no abdômen com 1,5 µg de dsRNA de *fruitless* e colocados, individualmente, junto com uma fêmea virgens não tratadas, oito dias após a injeção.

4.4.1 Análise da atividade dos machos

Os 23 casais foram observados durante a fotofase, anotando-se a atividade dos machos, como descrito no item 3.6.2, em comparação a grupo controle de machos não tratados. Nota-se pela Figura 12 que a atividade dos machos, tratados pelo dsfru como para os não tratados, inicia-se cedo e decresce ao longo do dia e que as moscas ficam em repouso durante a escotofase. As diferenças entre as duas distribuições não são estatisticamente significantes pelo teste de Willcoxon ($T=48,53$; $Z=0,251$; $p=0,802$). Estes dados sugerem que

não há diferença de atividade entre os machos injetados com dsRNA de *fruitless* e os machos não tratados.

Figura 12:

Comportamento de atividade de *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus* a partir da injeção de dsRNA de *fruitless*. Cont: indivíduos não injetados. fru: indivíduos injetados com dsRNA de *fruitless*. Observação ocorreu das 06:00 h às 21:00 h. As barras verticais mostram o número relativo de machos que apresentaram comportamentos de atividade (qualquer movimento durante o intervalo de observação) em relação ao número total de machos testados (N=23). Barra horizontal clara: Fotofase. Barra horizontal escura: Escotofase.

4.4.2 Análise do comportamento reprodutivo dos machos

Os 23 casais foram observados durante a fotofase anotando-se o comportamento reprodutivo que apresentaram. Os dados deste experimento estão mostrados na Figura 13. Foi observado que as atividades reprodutivas dos machos ocorrem nas primeiras horas da fotofase, tanto para os machos tratados como para os machos controles (não tratados). As diferenças entre as duas distribuições são estatisticamente significantes pelo teste de Willcoxon ($T=1,00$; $Z=1,992$; $p=0,046^*$), mostrando que os machos injetados com *dsfru*

realizam menor número de atividades reprodutivas que os machos não tratados do controle.

Figura 13: Comportamento reprodutivo de *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus* a partir da injeção de dsRNA de *fruitless*. Cont: indivíduos não injetados, dsfru: indivíduos injetados com dsRNA de *fruitless*. Observação ocorreu durante o período da manhã (06:00 – 12:00). As barras do histograma mostram a frequência de machos que apresentaram comportamentos reprodutivos em relação ao número total de machos testados (N=23). Barra horizontal clara: Fotofase. Barra horizontal escura: Escotofase.

4.4.3 Análise do comportamento de machos a partir do silenciamento de *fruitless* por RNAi parental.

Em vários organismos foi demonstrado que dsRNAs injetados nas fêmeas parentais passam da circulação na hemolinfa dessas fêmeas para seus ovócitos em desenvolvimento levando ao silenciamento dos genes específicos na prole (Bucher *et al.*, 2002; Lynch e Desplan, 2006; Khajura *et al.*, 2015). Assim, foi testado neste trabalho se o dsRNA parental de *fruitless* causaria o silenciamento desse gene nos machos das proles dessas fêmeas injetadas.

Machos produzidos por fêmeas injetadas com dsRNA de *fruitless* e de fêmeas não injetadas do estoque, foram obtidas. Passados 21 dias da emergência de machos dessas proles, 10 machos descendentes de fêmeas injetadas com dsRNA de *fruitless* (F1*fru*), foram colocados em um recipiente de vidro (15x10x15 cm) junto com 10 fêmeas virgens com a mesma idade. Em outra caixa, foram colocados 10 machos com 21 dias descendentes de fêmeas controle (F1CT) e 10 fêmeas virgens com mesma idade. Esse experimento foi repetido uma vez, totalizando 20 casais testados nessas condições. Esses casais foram, então, observados quanto ao comportamento de corte e cópula. A observação do comportamento (Figura 14) foi feita durante o período da manhã (6-12h). Foi observado que a maioria dos machos de ambas as condições experimentais, exibiram comportamento de corte e de atração de fêmeas. Dos 20 machos testados, oito F1*fru* copularam com fêmeas. Na condição controle, nove machos F1CT copularam com fêmeas. Esses dados mostram que não foram observadas diferenças significativas no comportamento de corte e cópula entre os machos descendentes de fêmeas tratadas e não tratadas com dsRNA de *fruitless*.

Figura 14: A e B: Comportamentos de pré-cópula em *A. sp.1*. A: Macho com glândula de feromônio exposta caracterizada pela protusão das membranas anais (seta) e vibração das asas; B: macho (esquerda) e fêmea (direita) ficam frente a frente. C: Cópula, quando o macho insere o edeago no ovipositor da fêmea.

4.4.4 Produção de espermatozóides em machos com o gene *fruitless* silenciado

O dsRNA_{fru} foi injetado em 10 machos com um dia após a emergência e, a seguir, dois deles a intervalos de aproximadamente cinco dias, foram dissecados e os testículos analisados quanto à produção de espermatozoides. Os cistos, em determinado estágio da espermiogênese, foram então contados. Figura 15 mostra que a produção de espermatozoides aumenta progressivamente até o ~12º dia após a emergência e indica que não houve diferenças significativas na produção de espermatozóides entre os machos injetados e os machos controles.

Figura 15: Número de cistos em espermiogênese de *A. sp.1* cujos machos adultos foram injetados com dsRNA_{fru} (triângulos escuros) no dia 01 após a emergência e de machos controles não tratados (quadrados claros).

4.5 Análise do comportamento de machos a partir do silenciamento de *period*

O gene-relógio *period* é expresso durante todas as fases do desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* e é responsável pela

ritmicidade das moscas durante a fase adulta. Porém, a expressão de *period* nas fases iniciais do desenvolvimento até a fase de pupa, não é requerida para uma ritmicidade normal nos adultos. Além disso, a contínua expressão de *period* nos adultos é essencial para a atividade locomotora rítmica, o que foi demonstrado pela injeção de dsRNA *per* no abdômen de machos adultos de *D. melanogaster*, apresentando distúrbios significativos no comportamento sexual e de locomoção (Ewer *et al.*, 1990).

Dessa forma, resolvemos testar se o comportamento de atividade de *A. sp.1 aff. fraterculus* é alterado a partir do silenciamento do gene *period*. Além disso, foi testado se o silenciamento deste gene afeta os comportamentos reprodutivos das moscas tratadas.

4.5.1 Silenciamento de *period*: atividade dos machos

Machos adultos virgens de *A. sp.1 aff. fraterculus* com 14 dias após a emergência foram injetados no abdômen com 1,5 µg de dsRNA de *period*. Os machos foram observados e os seus comportamentos de atividade foram registrados, conforme descrito no item 3.7.3. As observações ocorreram durante a fotofase (06:00 – 18:00) e escotofase (18:00 – 06:00), completando assim, 24h de experimento, que corresponde a um ciclo circadiano completo. Machos não injetados (controles), com a mesma idade também foram observados nas mesmas condições (Figura 16). Nota-se que os machos são mais ativos nas primeiras horas do dia e que as atividades decrescem gradativamente ao longo do dia e que os machos entram em repouso durante a escotofase, tanto para os machos tratados pelo dsRNA quanto os controles. As diferenças entre as duas distribuições não são estatisticamente significantes pelo teste de Wilcoxon ($T=51,01$; $Z=0,879$; $p=0,379$), indicando que não há diferença na atividade entre os machos injetados com dsRNA de *period* e os machos não tratados. Entretanto, os dados sugerem que os machos com o gene *per* silenciado seriam mais ativos que os machos controles no final da fotofase, entre 15:00 e 17:00 horas.

Figura 16: Comportamento de atividade de *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus* a partir da injeção de dsRNA de *period*. Cont: indivíduos não injetados. per: indivíduos injetados com dsRNA de *period*. Observação ocorreu durante 24 h (fotofase + escotofase). Tamanho das barras do histograma mostra o número de machos que apresentaram comportamentos de atividade (qualquer movimento durante o intervalo de observação) em relação ao número total de machos testados (N=20). Barra horizontal clara: Fotofase. Barra horizontal escura: Escotofase.

4.5.2 Silenciamento de *period* para análise do comportamento reprodutivo dos machos

Machos adultos virgens de *A. sp.1 aff. fraterculus* com 14 dias de emergência foram injetados no abdômen com 1,5 µg de dsRNA de *period*. Esses machos foram, então, observados quanto a comportamento de cópula, assim como descrito no item 3.7.1. Machos não injetados (controles), com a mesma idade também foram observados nas mesmas condições. A observação do comportamento foi feita durante o período da manhã (6-12h). Esse experimento foi repetido mais uma vez, totalizando 43 casais testados para cada condição experimental. Foi observado que 35 dos 43 machos injetados com dsRNA de *period* copularam. Por sua vez, foi observada cópula

para 31 dos 43 machos não injetados. As diferenças entre as duas proporções não são estatisticamente significantes pelo teste Tabela de Contingência ($\chi^2 = 0,0428$; $p = 0,83$ ns). Além disso, não foi observado diferença visual na movimentação e no comportamento de corte dos machos tratados e não tratados. Esses dados sugerem que não houve alteração comportamental nos machos tratados com dsRNA de *period* em relação aos machos não tratados.

4.5.3 Silenciamento de *period*: comportamento sexual de machos

Machos adultos virgens de *A. sp.1 aff. fraterculus* com 14 dias após a emergência foram injetados no abdômen com 1,5 μ g de dsRNA de *period*. Esses machos foram, então, observados quanto aos seus comportamentos reprodutivos, assim como descrito no item 3.7.2. As observações ocorreram durante a fotofase (06:00 – 18:00) e escotofase (18:00 – 03:00). Machos não injetados (controles), com a mesma idade também foram observados nas mesmas condições. Um total de 20 casais foram testados para cada uma das condições experimentais. Como mostra a Figura 17, as atividades reprodutivas dos machos concentram-se nas primeiras horas da fotofase, como já foi visto no item 4.4.2 acima descrito. As diferenças entre as duas distribuições não são estatisticamente significantes pelo teste de Willcoxon ($T=10,02$; $Z=0,105$; $p=0,916$). Estes dados sugerem que não há diferença em relação a comportamento reprodutivo entre os machos injetados com dsRNA de *period* e os machos não tratados.

Figura 17: Comportamento reprodutivo de *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus* a partir da injeção de dsRNA de *period*. Cont: indivíduos não injetados. per: indivíduos injetados com dsRNA de *period*. Observação ocorreu durante o período de fotófase e escotofase, indicados pela barra abaixo do gráfico. As barras do histograma mostram o número relativo de machos que apresentaram comportamentos reprodutivos em relação ao número total de machos testados (N=20).

4.5.4 Silenciamento de *period*: produção de espermatozóides

Estas análises foram feitas segundo a metodologia descrita para análise similar com o gene *fruitless* e descrita no item 3.6.4 acima. A Figura 18 indica que não houve diferença significativa na produção de espermatozóides entre os machos injetados e os machos controles. Mostram, ainda, que a produção aumenta progressivamente até o ~12º. dia após a emergência.

Figura 18: Número de cistos em espermiogênese de *A. sp.1* cujos machos adultos foram injetados com dsRNAper (triângulos escuros) no dia 01 após a emergência e de machos controles não tratados (quadrados claros).

5. Discussão

Algumas espécies de *Anastrepha* apresentam um complexo ritual no comportamento reprodutivo dos machos para atrair as fêmeas como parceiras para a cópula (Aluja *et al.*, 1999). O comportamento reprodutivo em outros Dípteros, incluindo a espécie de moscas-das-frutas *Ceratitis capitata*, é influenciado pelo gene *fruitless* (*fru*) (revisão em Salvemini *et al.*, 2009). Além deste, o gene *period* interfere nos processos reprodutivos pois participa no controle do ritmo circadiano de locomoção dos indivíduos adultos em insetos, incluindo a mosca-das-frutas *C. capitata* (Mazzotta *et al.*, 2005) e espécies de *Bactrocera* (An *et al.*, 2002; Miyatake *et al.*, 2002). Baseados nessas informações, o presente estudo propôs a prospecção da participação dos genes *period* e *fruitless* no comportamento reprodutivo e na locomoção de *A. sp.1 aff. fraterculus*. Isso exigiu, inicialmente, a adequação dos protocolos de amplificação e sequenciamento de fragmentos dos genes *fru* e *per*, pois os iniciadores descritos na literatura por Sobrinho e Brito (2010) e Barr *et al.*, (2005), respectivamente, não amplificaram esses genes nesta espécie nas condições padrão do laboratório. Após o desenho de novos pares de iniciadores e [testes de vários protocolos de amplificação, foi obtido um fragmento de 500 pb que correspondia a uma região do exon C3 do gene *fru* (Sobrinho e Brito, 2010) e um fragmento de 300 pb cuja sequência correspondia à região C6 do gene *per* (Barr *et al.*, 2005), uma região altamente conservada cuja função ainda não está esclarecida (Collot *et al.*, 1988). Esses fragmentos foram então utilizados para a síntese dos RNAs de dupla fita (dsRNA) a serem empregados nos experimentos de silenciamento dos dois genes.

A síntese dos dsRNAs foi dificultada pois os protocolos de amplificação, descritos na literatura estavam incompletos (Kennerdell e Carthew, 1998) ou não funcionaram adequadamente nas condições do laboratório. Os protocolos foram alterados várias vezes, principalmente quanto a duração da reação de transcrição *in vitro* e da quantidade de DNA molde ideais para a síntese de dsRNA. Foi então, como indicado por Chen *et al.*, (2008), feita a

clonagem do fragmento de DNA de dupla fita gerando, de modo eficiente, o dsRNA necessário. Posteriormente, mostrou-se que alternativamente à essa técnica trabalhosa seria bastante diminuir a concentração de DNA na segunda PCR da reação de preparo de dsRNA. Esses fragmentos com terminais T7 foram, então, utilizados com sucesso para a síntese de dsRNA de *fruitless* com cerca de 500 pb e do *period* com cerca de 300 pb, que foram utilizados nos experimentos de silenciamento dos dois genes.

Antes de iniciar os experimentos com os dsRNAs, foi necessária a padronização do protocolo de injeção do dsRNA nos adultos de *A. sp.1*, o que reduziu da taxa de mortalidade das moscas injetadas, de 30-40% para cerca de 10% , apropriada para os experimentos programados. Este método de silenciamento gênico nos indivíduos adultos, foi desenvolvido por Dzitoyeva et al., (2001) para *D. melanogaster* mostrando que a injeção de RNAi de um gene no abdômen, pode induzir alterações na expressão do gene no SNC do inseto.

Genes de comportamento podem atuar de diferentes maneiras. O “gene-relógio” *period*, por exemplo, é expresso durante todas as fases do desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* e é responsável pela ritmicidade das moscas durante a fase adulta. Porém, a expressão de *period* nas fases iniciais do desenvolvimento até a fase de pupa, não é requerida para uma ritmicidade normal nos adultos. Além disso, a contínua expressão de *period* nos adultos é essencial para a atividade locomotora rítmica e o comportamento sexual, como foi demonstrado pelo emprego de mutantes do gene *per* e de indivíduos transformantes em *Drosophila*, que apresentaram distúrbios significativos no comportamento de locomoção e sexual (Ewer et al., 1990).

A injeção do dsRNA_{per} no abdômen machos adultos de *A. sp.1 aff. fraterculus* resultou no silenciamento total do gene oito dias após a injeção. No entanto, a análise mostrou um decréscimo gradativo no volume dos fragmentos amplificados nos primeiros 4 a 5 dias após a injeção. Este resultado poderia ser interpretado de duas formas. Primeiro, que o silenciamento do gene ocorre gradativamente e o segundo, que o gradiente observado nos

dias sucessivos à injeção resultou da amplificação do próprio dsRNA_{per} que estaria ainda em circulação na hemolinfa dos machos injetados. Por esta segunda hipótese a diminuição seria esperada pelo gasto gradativo do dsRNA exógeno. Na realidade, não há como resolver esse problema com os dados do presente estudo. Entretanto, como o gene *per* é constitutivo, se não tivesse sido silenciado nos experimentos, o decréscimo gradativo não seria observado pois deveria aparecer uma banda expressiva em todos os dias em que os exemplares foram analisados. Considerando qualquer das alternativas, os dados mostram que possivelmente o gene estaria parcialmente silenciado já no 3º. ou 4º. dia após a injeção. Em *Drosophila*, experimento similar mostrou que o silenciamento de genes ocorre entre o 2º. e 3º. dia após a injeção. Ritmos endógenos distintos do desenvolvimento dessas espécies, com ciclo mais longo em *Anastrepha*, seriam explicativas para essas diferenças.

Análises da atividade dos machos controle (não tratados) durante o ciclo circadiano CE foram feitas independentemente nos experimentos com os genes *per* e *fru*. Essas análises, feitas pela primeira vez nesta espécie, mostraram um padrão comum encontrado em outras espécies, nas quais os machos são mais ativos nas primeiras horas da fotofase e que a atividade decresce gradativamente oscilando até o início da escotofase, quando os machos entram em repouso. A atividade diurna dos machos de *A. sp.1* ocorre com um perfil unimodal no ciclo CE, de modo similar ao observado em *Anastrepha ludens* (Chire *et al.*, 2013), em *Anastrepha zenildae* (Almeida *et al.*, 2011) e *Ceratitis capitata* (Mazzotta *et al.*, 2005). Em espécies de *Bactrocera*, foi mostrado que a atividade locomotora também apresenta um perfil unimodal no ciclo circadiano, mas a atividade ocorre durante a escotofase (An *et al.*, 2002; Miyatake *et al.*, 2002). Em *Drosophila*, por exemplo e de modo distinto, o ciclo circadiano é bimodal (Hall, 2003; Collins *et al.*, 2004).

Em *Drosophila* e outros organismos, a oscilação das atividades locomotoras ocorre em função da oscilação circadiana dos níveis do mRNA de *per* e dos níveis de proteína PER. Durante o dia, há um aumento gradativo dos níveis de mRNA de *per*, atingindo seu pico no começo da noite. Com o aumento da transcrição de *per*, há o aumento da tradução deste gene,

resultando em um incremento nos níveis de proteína PER, que atinge o máximo algumas horas após o pico do seu respectivo mRNA, no meio da noite. Como a proteína PER, ao inibir a transcrição dos genes *dclock* e *cycle*, regula negativamente sua própria transcrição, os níveis de RNAm de *per* caem durante a escotofase, até chegar aos seus níveis mínimos no começo da fotofase. Isso acarreta uma diminuição dos níveis de proteína PER, que é progressivamente fosforilada e degradada até alcançar seus níveis mínimos no meio do dia (Reppert e Sauman, 1995; Dunlap, 1999). Na mosca-das-frutas *C. capitata* (Mazzotta *et al.*, 2005) e em *Musca domestica* (Codd *et al.*, 2007), foi observado que o ritmo no nível de transcrição de *per* ocorre de maneira similar a *D. melanogaster*. No entanto, a proteína PER é mantida em nível constante, tanto na fotofase como na escotofase, sugerindo que o mecanismo de funcionamento de PER em mosca-das-frutas e em *Musca domestica* pode ser diferente de *D. melanogaster*. Análise dos machos tratados pelo dsRNA_{per} em *A. sp.1 aff. fraterculus* mostrou um ciclo circadiano que não diferiu estatisticamente do observado para os machos não tratados em um regime cíclico de Claro/Escuro. Esses dados corroboram o observado para o mutante *per⁰⁴* em *D. melanogaster*, em que não há produção de proteína PER funcional e também, que não há alteração no ritmo circadiano quando as moscas são colocadas em um regime cíclico de 12 horas no claro, seguido de 12 horas no escuro (Hamblen-Coyle *et al.*, 1989; Hamblen *et al.*, 1998).

Além da atividade geral dos machos, o ciclo circadiano do comportamento reprodutivo apresenta diferenças entre espécies de mosca-das-frutas. Aluja *et al.* (1999), em uma revisão, descreve o ciclo do comportamento reprodutivo de 21 espécies de *Anastrepha*, a maioria das quais, exibem um ciclo circadiano com perfil unimodal, com atividade em diversos período da fotofase, das 6 às 10, das 8 às 11, das 11 às 15, das 14 às 17 e das 15 às 18/19 horas. A exceção foi a *A. serpentina* do México, que exibiu um ciclo bimodal com picos aproximadamente as 10 h e 16 h. No presente trabalho, a análise do comportamento de reprodução dos machos de *A. sp.1* tratados com dsRNA_{per}, mostrou que tanto os machos tratados quanto os

controles, exibiram atividade reprodutiva nas primeiras horas da fotofase, corroborando observações anteriores nesta espécie (Selivon *et al.*, 2005; Vera *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2015). Além disso, não foram encontradas diferenças quanto ao número de indivíduos ativos, nem quanto a duração do período de atividades entre o comportamento reprodutivo dos machos tratados comparado aos seus controles não tratados. Efeito modesto de alteração no período circadiano de eclosão das larvas de *Bombix mori* foi também observado com o gene *per* silenciado através de linhagens transformadas com plasmídeos contendo dsRNA_{per} (Sandrelli *et al.*, 2007). Assim, os dados do presente trabalho mostram que o ciclo circadiano de *A. sp.1* não foi alterado pelo silenciamento de *per*, sugerindo que o controle do ciclo circadiano em *Anastrepha*, talvez seja similar ao de *Ceratitis capitata*. Análises futuras serão necessária para esclarecer estes fatos.

Alguns genes, como o *per*, estão também relacionados com o controle das atividades sexuais dos insetos (Ewer *et al.*, 1990). Neste trabalho, foi avaliado se o silenciamento de *per* estaria afetando a espermatogênese dos machos tratados. A análise mostrou que a produção de espermatozoides, avaliada pela contagem das espermátides, não foi alterada pelo silenciamento do gene *per* em relação a produção nos machos controle.

Além do gene *per*, outro objeto de estudo neste trabalho, foi o *fruitless* que coordena o comportamento sexual de machos em numerosas espécies de insetos (rev. Salvemini *et al.*, 2009). Utilizando a espécie nominal *A. fraterculus*, o gene *fru* foi estudado em termos populacionais relativos aos processos seletivos a que está submetido (Sobrinho e Brito, 2010; Szrajer, 2011). Sabe-se que mutações em regiões distintas do gene, em *Drosophila*, causam efeitos distintos, sendo um efeito letal ou uma interferência no comportamento dos machos, enquanto que as fêmeas não são afetadas. Os resultados do presente trabalho, com o silenciamento do gene *fruitless* em *A. sp.1* através do dsRNA_{fru}, mostraram que a atividade geral dos machos não foi afetada em relação a dos machos não tratados, que apresentaram a oscilação diurna do ciclo circadiano. A análise do comportamento reprodutivo dos machos, mostrou que os machos tratados pelo dsRNA_{fru} apresentavam atividade

relacionada à reprodução nas primeiras horas do ciclo circadiano, juntamente com os machos controles (Selivon *et al.*, 2005; Vera *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2015). Entretanto, o número de machos tratados com *dsRNAfru* que realizaram as atividades reprodutivas foi significativamente menor em relação aos machos não tratados. Nenhuma diferença significativa no período de atividade dos machos foi observada neste tipo de tratamento com *dsRNAfru*. Isto indica que o *dsRNAfru* interferiu parcialmente com a atividade do gene *fruitless*, ou então, que o controle das atividades reprodutivas tem um mecanismo de controle mais complexo. Tomando-se como exemplo o gene *period* de *Musca*, acima citado, poderíamos concluir que a alteração do comportamento foi modesta. Essa modesta alteração pode estar relacionada ao fato de que *fruitless*, em *D. melanogaster*, estabelece o comportamento sexual dos machos durante a metamorfose, quando a proteína FRU^M, que é descrita como a variante proteica responsável por estabelecer comportamento sexual dos machos, começa a ser traduzida (Arthur *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000). No entanto, a variante proteica FRU^M continua sendo expressa após a fase de pupa, podendo assim, essa expressão ser importante para o comportamento sexual normal dos machos na fase adulta. Os machos da progênie de fêmeas tratadas com *dsRNAfru* não sofreram alteração no comportamento reprodutivo. Isso corrobora os dados da literatura que indicam que nas fases iniciais do desenvolvimento a variante proteica FRU^M não é produzida em *D. melanogaster* (Arthur *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000). Assim, o RNAi parental não tem efeito nas primeiras fases do desenvolvimento.

Além disso, há que se ressaltar que espécies de *Anastrepha* não possuem o Músculo de Lawrence (MOL). Este músculo existe somente nos machos de *Drosophila melanogaster* e é composto por um par de grandes músculos no tergito A5 (Lawrence e Johnson, 1984). A formação desse músculo é coordenada pelo gene *fruitless* (Usui-Aoki *et al.*, 2000). No entanto, 67 dentre 95 espécies da subfamília Drosophilinae, não possuem o MOL (Gailey *et al.*, 1997). Em algumas das espécies, por exemplo a *Drosophila heteroneura*, o gene *fruitless* não possui o éxon que contém sequências que sofrem “splicing” sexo-específico, além de não apresentar alguns transcritos sexo-

específicos que são relativos a esse éxon em *D. melanogaster* (Davis *et al.*, 2000a).

Entretanto, em *Anastrepha* a estrutura do gene *fruitless* não é conhecida em sua totalidade, pois a extremidade 5' onde existe o promotor P1 que controla o éxon "sexo-específico" em *D. melanogaster*, ainda não foi descrita (Sobrinho e Brito, 2010; Szrajer, 2011). Além disso, pode ser que a atuação da proteína DSXM atue diminuindo os efeitos do silenciamento de *fruitless*, visto que esta proteína também atua para estabelecer comportamento sexual normal nos machos e está presente em machos selvagens. Desse modo, o entendimento do papel de coordenação do comportamento reprodutivo pelo gene *fruitless* em *A. sp.1* dependerá de análises futuras com o emprego de outros métodos de análise, como por exemplo, o silenciamento do gene *fruitless* nas fases tardias da larva e nas fases iniciais da pupa.

6. Conclusões

Através deste projeto pode-se concluir que:

1. Os genes *fruitless* e *period* de *A. sp.1 affinis fraterculus* apresentam alta homologia com outras espécies de *Anastrepha*.
2. O dsRNA_{fru} e o dsRNA_{per} silenciaram os genes respectivos dessa espécie.
3. O comportamento locomotor dos machos dessa espécie apresenta um perfil unimodal no ciclo circadiano com regime Claro/Escuro.
4. O comportamento reprodutivo dos machos dessa espécie ocorre nas primeiras horas da fotofase.
5. O comportamento locomotor dos machos adultos não é alterado pelo silenciamento tanto do gene *period* quanto do gene *fruitless*.
6. O comportamento reprodutivo dos machos adultos silenciados com dsRNA_{per} não foi alterado.
7. O silenciamento do gene *fruitless* causou um decréscimo no número de machos apresentando comportamento reprodutivo.
8. Os machos da progênie de fêmeas tratadas com dsRNA_{fru} não tiveram alteração do comportamento reprodutivo.
9. A produção de espermatozoides em machos tratados com dsRNA_{per} e dsRNA_{fru} não foi alterada.

7. Referências bibliográficas

- Allada, R.; White, N. E.; So, W. V.; Hall, J. C., Rosbash, M. 1998. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian *Clock* disrupts circadian rhythms and transcription of *period* and *timeless*. *Cell*, 93, 791–804.
- Almeida, L. M.; Araújo, A.; Mendes, N.H.D.; Souza, J. M. G. A.; Menezes A. A. L. 2011. The temporal pattern of mating behavior of the fruit fly, *Anastrepha zenilldae* in the laboratory. *Journal of Insect Science* 11:151 available online: insectscience.org/11.151.
- Aluja, M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annual Review of Entomology*, 39, 155-178.
- Aluja, M.; Piñero, J.; Jácome, I.; Diaz-Fleischer, F.; Sivinski, J. 1999. Behavior in the genus *Anastrepha* (Trypetinae: Toxotrypaninae), p. 375-406. In: Aluja, M. e Norrbom, A.L. (eds) *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*. CRC Press, Boca Raton, USA. 944 pp.
- An, X.; Wilkes, K.; Bastian, Y.; Morrow, J. L.; Frommer, M.; Raphael, K. A. 2002. The *period* gene in two species of tephritid fruit fly differentiated by mating behaviour. *Insect Molecular Biology*, **11**, 419–430.
- Anand, A.; Vilella, A.; Ryner, L. C.; Carlo, T.; Goodwin, S. F.; Song, H. J.; Gailey, D. A.; Morales, A.; Hall, J. C.; Baker, B. S. *et al.* 2001. Molecular genetic dissection of the sexspecific and vital functions of the *Drosophila melanogaster* sex determination gene *fruitless*. *Genetics*, 158, 1569-1595.
- Arthur, B. I.; Jallon, J. M.; Caflisch, B.; Choffat, Y.; Nothiger, R. 1998. Sexual behaviour in *Drosophila* is irreversibly programmed during a critical period. *Current Biology* 8, 1187-1190.
- Barr, N. B.; Cui, L. e McPheron, B. A. 2005. Molecular systematics of nuclear gene *period* in genus *Anastrepha* (Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 98, 173-180.
- Bell, L. R.; Horabin, J. I.; Schedl, P.; Cline, T. W. 1991. Positive autoregulation of *Sexlethal* by alternative "splicing" maintains the female determined state in *Drosophila*. *Cell*, 65, 229-239.

- Bell, L. R.; Maine, E. M.; Schedl, P.; Cline, T. W. 1988. *Sex-lethal*, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA "splicing" and sequence similar to RNA binding proteins. *Cell*, 55, 1037-1046.
- Belote, J. M.; McKeown, M.; Boggs, R. T.; Ohkawa, R.; Sosnowski, B. A. 1989. The molecular genetics of *transformer*, a genetic switch-controlling sexual differentiation in *Drosophila*. *Developmental Genetics*, 10, 143-154.
- Bertossa, R.C.; van de Zande, L.; Beukeboom, L. W. 2009. The *fruitless* gene in *Nasonia* displays complex sex-specific "splicing" and contains new zinc finger domains. *Molecular Biology and Evolution*, 26, 1557–1569.
- Boggs, R. T.; Gregor, P.; Idriss, S.; Belote, J. M.; McKeown, M. 1987. Regulation of sexual differentiation in *Drosophila melanogaster* via alternative "splicing" of RNA from the *transformer* gene. *Cell*, 50:739-747.
- Bucher, G.; Scholten, J.; Klinger, M. 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Current Biology*, 12, 85-86.
- Burtis, K. C. e Baker, B.S. 1989. *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell*, 56, 997-1010.
- Cáceres, C.; Segura, D. F.; et al. 2009. Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization and cytology. *Biological Journal of Linnean Society*. 97, 152-165.
- Chang, D. C. e Reppert, S. M. 2003. A novel C-terminal domain of *Drosophila* PERIOD inhibits dCLOCK: CYCLE-mediated transcription. *Current Biology*, 13, 758-762.
- Chen, S. L.; Dai, S. M; Lu, K. H. ; Chang, C. 2008. Female-specific *doublesex* dsRNA interrupts yolk protein gene expression and reproductive ability in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 155-165.
- Chire, J.C; Kaub, K.; Zou, S.; Liedo, P.; Altamiro-Robles, L.; Ingram, D.; Carey, J. 2003. Deleterious effect of suboptimal diet on rest-activity cycle in *Anastrepha ludens* manifests itself with age. *Scientific Reports* 3, 1773.

- Codd, V.; Dolezel, D.; Stehlik, J., I 2007. Circadian rhythm gene regulation in the housefly *Musca domestica*. *Genetics*, 177, 1539-1551.
- Collins, B.H.; Rosato, E.; Kyriacou, C.P. 2004. Seasonal behavior in *Drosophila melanogaster* requires the photoceptors, the circadian clock, and phospholipase C. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 101, 1945-1950.
- Colot, H. V.; Hall, J. C.; Rosbash, M. 1988. Interspecific comparison of the period gene of *Drosophila* reveals large blocks of non-conserved coding DNA. *The EMBO Journal*, . 7, 3929.
- Costa, R. e Kyriacou, C. P. 1998. Functional and evolutionary implications of natural variation in clock genes. *Current Opinion in Neurobiology*, 8, 659-664.
- Crews, S. T.; Thomas, J. B. e Goodman, C. S. 1988. The *Drosophila single-minded* gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the *per* gene product. *Cell*, 52, 143–151.
- Darlington, T. K. *et al.* 1998. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science*, 280, 1599–1603.
- Davis, T.; Kurihara, J.; Yamamoto, D. 2000a. Genomic organisation and characterisation of the neural sex-determination gene *fruitless (fru)* in the Hawaiian species *Drosophila heteroneura*. *Gene*, 246, 143–149.
- Davis, T.; Kurihara, J.; Yoshino, E.; Yamamoto, D. 2000b. Genomic organisation of the neural sex determination gene *fruitless (fru)* in the Hawaiian species *Drosophila silvestris* and the conservation of the fru BTB protein-protein-binding domain throughout evolution. *Hereditas*, 132, 67–78.
- Demir, E. e Dickson, B. J..2005. *fruitless* "splicing" specifies male courtship behavior in *Drosophila*. *Cell*, 121, 785-794.
- Dias, V.A.; Silva, J.G. *et al.* 2016. An integrative multidisciplinary approach to understanding cryptic divergence in Brazilian species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 117, 725-756
- Dunlap, J. C. 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96, 271-290.

- Dzitoyeva, S.; Dimitrijevic, N.; Manev, H. 2001. Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system. *Molecular Psychiatry*, 6, 665-670.
- Edery, I.; Zwiebel, L. J.; Dembinska, M. E.; Rosbash, M. 1994. Temporal phosphorylation of the *Drosophila period* protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 2260-2264.
- Ewer, J.; Hamblen-Coyle, M.; Rosbash, M.; Hall, J. C. 1990. Requirement for period gene expression in the adult and not during development for locomotor activity rhythms of imaginal *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurogenetics*, 7, 31-73.
- Foote, R. H.; Blanc, F. L.; Norrbom, A. L. 1993. Handbook of the fruit flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico. Comstock, Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Gailey, D. A.; Billeter, J. C.; Liu J. H., Bauzon, F.; Allendorfer, J. B.; Goodwin, S. F. 2006. Functional conservation of the *fruitless* male sex-determination gene across 250 Myr of insect evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 633–643.
- Galey, D. A.; Ohshima, S. *et al.* 1997. The muscle of Lawrence in *Drosophila*: a case of repeated evolutionary loss. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 94, 4543-4547.
- Gekakis, N. *et al.* 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, 280, 1564–1569.
- Goday, C.; Selivon, D.; Perondini, A. L. P.; Greciano, P. G.; Ruiz, M. F. 2006. Cytological characterization of sex chromosomes and ribosomal DNA location in *Anastrepha* species (Diptera, Tephritidae). *Cytogenetic and genome research*, 114(1), 70-76.
- Gomez-Cendra, P.; Calcagno, G.; Belluscio, L.; Vilardi, J. C. 2011. Male courtship behavior of the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus*, from Argentinian laboratory strain. *Journal Insect Science*, 11:175.
- Greenspan, R. J. e Ferveur J. F. 2000. Courtship in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics*, 34, 205–232.

- Hall, J.C. 1994. The mating of a fly. *Science*, 264, 1702–1714.
- Hall, J.C. 2003. Genetics and molecular biology of rhythms in *Drosophila* and other insects. *Advances in Genetics*, 48: 1-280.
- Hamblen, M. J.; White, N. E.; Emery, P. T.; Kaiser, K.; Hall, J. C. 1998. Molecular and behavioral analysis of four period mutants in *Drosophila melanogaster* encompassing extreme short, novel long, and unorthodox arrhythmic types. *Genetics*, 149, 165-178.
- Hamblen-coyle, M.; Konopka, R. J.; Zwiebel, L. J.; Colot, H. V.; Dowse, H. B.; Rosbash, M.; Hall, J. C. 1989. A new mutation at the period locus of *Drosophila melanogaster* with some novel effects on circadian rhythms. *Journal of Neurogenetics*, 5, 229-256.
- Hao, H.; Allen, D. L.; Hardin, P. E. 1997. A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 17, 3687–3693.
- Hardin, P. E.; Hall, J. C.; Rosbash, M. 1990. Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, 343, 536–540.
- Hedley, M. e Maniatis, T. 1991. Sex-specific “splicing” and polyadenylation of *dsx* pre-mRNA requires a sequence that binds specifically to tra-2 protein in vitro. *Cell*, 65, 579-586.
- Hernandez-Ortiz, V.; Bartolucci, A. F.; Morales-Valles, P.; Frías, D.; Selivon, D. 2012. Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae): a multivariate approach for the recognition of South American morphotypes. *Annals of Entomological Society of America*, 105, 305-318.
- Hernandez-Ortiz, V.; Gomez-Anaya, J. A.; Sanchez, A. G.; McPheron, A.; Aluja, M. 2004. Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype. *Bulletin of Entomological Research*, 94, 487-499.

- Hertel, K. J.; Lynch, K. W.; Hsiao, E. C.; Liu, E. H. T.; Maniatis, T. 1996. Structural and functional conservation of the *Drosophila doublesex* "splicing" enhancer repeat elements. *RNA*, 2, 969-981.
- Hoffman, E. C. *et al.* 1991. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*, 252, 954-958.
- Hogenesch, J. B.; Gu, Y. Z.; Jain, S. e Bradfield, C. A. 1998. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 95, 5474-5479.
- Hoshijima, K.; Inoue, K.; Higuchi, I.; Sakamoto, H.; Shimura, Y. 1991. Control of *doublesex* alternative "splicing" by *transformer* and *transformer-2* in *Drosophila*. *Science*, 252, 833-836.
- Ito, H.; Fujitani, K.; Usui, K. A. Z. U. E.; Shimizu-Nishikawa, K.; Tanaka, S.; Yamamoto, D. 1996. Sexual orientation in *Drosophila* is altered by the *satori* mutation in the sex-determination gene *fruitless* that encodes a zinc finger protein with a BTB domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 9687-9692.
- Kennerdell, J. R. e Carthew, R. W. 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell*, 95, 1017-1026.
- Khajujira, C.; Véles, A. M.; Rangasamy, M. *et al.* 2015. Parental RNA interference of genes involved in embryonic development of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera* (LeConte). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 63, 54-62.
- Kimura, K.; Hachiya, T.; Koganezawa, M.; Tazawa, T.; Yamamoto, D. 2008. *fruitless* and *doublesex* coordinate to generate male specific neurons that can initiate courtship. *Neuron*, 59, 759-769.
- Konopka, R. J. e Benzer, S. 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 68, 2112-2116.
- Lawrence, P.A. e Johnson, P. The muscle pattern of a segment of *Drosophila* may be determined by neuros and not by contributing myoblasts. *Cell*, 45, 505-513.

- Lee, G.; Foss, M.; Goodwin, S. F.; Carlo, T.; Taylor, B. J.; Hall, J. C. 2000. Spatial, temporal, and sexually dimorphic expression patterns of the *fruitless* gene in the *Drosophila* central nervous system. *Journal of Neurobiology*, 43(4), 404-426.
- Liu, X.; Zwiebel, L. J.; Hinton, D.; Benzer, S.; Hall, J. C.; Rosbash, M. 1992. The *period* gene encodes a predominantly nuclear protein in adult *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 12, 2735-2744.
- Lynch, J. A.; Desplan, C. 2006. A method for parental RNA interference in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Nature Protocols-Electronic Edition* 1: 486.
- Malavasi, A.; Zucchi, R. A.; Sugayama, R. L. 2000. Biogeografia. In: "Moscas das frutas de interesse econômico no Brasil: conhecimento básico e aplicado", Malavasi, A. e Zucchi, R.A. (eds.), Holos, Ribeirão Preto, p. 93-98.
- Manoli, D. S.; Foss, M.; *et al.* 2005. Male-specific *fruitless* specifies the neural substrates of *Drosophila* courtship behaviour. *Nature*, 436, 395–400.
- Mazzotta, G. M. F.; Sandrelli, M. A.; Zordan, M.; Mason, C.; Benna *et al.* 2005. The clock gene *period* in the medfly *Ceratitis capitata*. *Genetic Research*, 86, 13–30.
- Miyatake, T.; Matsumoto, A.; Matsuyama, T.; Ueda, H. R.; Toyosato, T.; Tanimura, T. 2002. The *period* gene and allochronic reproductive isolation in *Bactrocera cucurbitaceae*. *Proceedings of the Royal Society, London*, 269, 2467-2472.
- Morgante, J. S.; Malavasi, A.; Prokopy, R. J. 1983. Mating behavior of wild *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) on a caged host tree. *Florida Entomologist*, 234-241.
- Panda, S.; Hogenesch, J. B. ; Kay, S. A. 2002. Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, 417, 329-335.
- Pike, N. ; Meats, A. 2002. Potential for mating between *Bactrocera tryoni* (Froggatt) and *B. neohumeralis* (Hardy) (Diptera: Tephritidae). *Australian Journal of Entomology*, 41, 70–74.

- Prezotto, L. F. 2008. Análise do ITS1 do DNA ribossômico em espécies do complex *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae). Dissertação Mestrado, Ciências Biológicas, USP, São Paulo.
- Prezotto, L. F. 2013. Tipificação de linhagens de *Wolbachia* do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) da Região Neotropical por análise de locos múltiplos. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 102 p.
- Reppert, S. M.; Sauman, I. 1995. *Period* and *timeless* tango: a dance of two clock genes. *Neuron*, 1, 983-986.
- Rideout, E. J.; Billeter, J. C.; Goodwin, S. F. 2007. The sex-determination genes *fruitless* and *doublesex* specify a neural substrate required for courtship song. *Current Biology*, 17, 1473-1478.
- Ruiz, M. F.; Eirín-López, J. M.; Stefani, R. N.; Perondini, A. L. P.; Selivon, D., Sánchez, L. 2007b. The gene *doublesex* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, tephritidae) and its evolution in insects. *Development Genes and Evolution*, 217, 725-731.
- Ruiz, M. F.; Milano, A.; Salvemini, M.; Eirín-López, J. M.; Perondini, A. L. P.; Selivon, D.; Polito, C.; Saccone, G.; Sánchez, L. 2007a. The gene *transformer* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *PLoS ONE*, 2, e1239.
- Ruiz, M. F.; Stefani R. N.; Mascarenhas, R. O.; Perondini, A. L.; Selivon D.; Sánchez, L. 2005. The gene *doublesex* of the fruit fly *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). *Genetics*, 171, 849–854.
- Rutila, J. E. et al. 1998. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila period* and *timeless*. *Cell*, 93, 805–814.
- Ryner, L. C.; Baker, B. S. 1991. Regulation of *doublesex* pre-mRNA processing occurs by 3'-splice site activation. *Genes and Development*, 5, 2071-2085.
- Ryner, L. C.; Goodwin, S. F.; et al. 1996. Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the *fruitless* gene. *Cell*, 87, 1079–1089.

- Saez, L. ;Young, M. W. 1996. Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins *period* and *timeless*. *Neuron*, 17, 911-920.
- Sakai, T. ;Ishida, N. 2001. Circadian rhythms of female mating activity governed by clock genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98, 9221-9225.
- Salvemini, M.; Polito. C.; Saccone, G. 2010. *fruitless* alternative "splicing" and sex behaviour in insects: an ancient and unforgettable love story? *Journal of Genetics*, 89,287–299.
- Salvemini, M.; Robertson, M.; Aronson, B.; Atkinson, P.; Polito, L. C.; Saccone, G. 2009. *Ceratitis capitata transformer-2* gene is required to establish and maintain the autoregulation of *Cctra*, the master gene for female sex determination. *International Journal of Development Biology*, 53, 109–120.
- Sambrook, J.; Frisch, E.; Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. V., p. 1–3.
- Sánchez Rodríguez, L. 2008. Sex-determining mechanisms in insects. *International Journal of Developmental Biology*, 52, 837-856.
- Sandrelli, F.; Cappellozza, S. et al. 2007. Phenotypic effects induced by knock-down of the period clock gene in *Bombix mori*. *Genetic Research*, 89, 73-84.
- Sarno, F.; Eirín-López, J. M.; Perondini, A. L. P.; Selivon, D.; and Sánchez, L. 2010. The gene *transformer-2* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 140.
- Schetelig, M. F.; Milano, A., Saccone, G., Handler, A. M. 2012. Male only progeny in *Anastrepha suspensa* by RNAi-induced sex reversion of chromosomal females. *Insect biochemistry and molecular biology*, 42, 51-57.
- Sehgal, A.; Rothenfluh-Hilfiker, A.; Hunter-Ensor, M.; Chen, Y.; Myers, M. P.; Young, M. W. 1995. Rhythmic expression of *timeless*: a basis for promoting circadian cycles in *period* gene autoregulation. *Science*, 270, 808–810.

- Selivon, D. 1996. Estudo sobre a diferenciação populacional em *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera, Tephritidae). Tese de Doutorado, Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Selivon, D.; Morgante, J. S. 1997. Reproductive isolation between *Anastrepha bistrigata* and *A. striata* (Diptera:Tephritidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 20, 583-585.
- Selivon, D. ; Perondini, A. L. P. 1998. Eggshell morphology in two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Annals of Entomological Society of America USA*, 91, 473-478.
- Selivon, D.; Perondini, A. L. P.; Morgante, J. S. 1999. Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Genetics and Molecular Biology*, 22, 507-510.
- Selivon, D.; Perondini, A. L. P.; Morgante, J. S. 2005. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Annals of Entomological Society of America USA*, 98, 367-381.
- Selivon, D.; Vretos, C.; Fontes, L.; Perondini, A. L. P. 2004. New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex, pp 253-258. Proc. 6th International Fruit Flies Symposium, 6-10 May, Stellenbosh, South Africa, B. Barnes (ed.), Isteg Scientific Publications, Irene, Africa do Sul.
- Shirangi, T. R.; McKeown, M. 2007. Sex in flies: what 'body-mind' dichotomy? *Developmental Biology*, 306, 10-19.
- Sivinski, J. Burk, T. 1989. Reproductive and mating behaviour. In: Robinson AS, Hooper G, Editors. World Crop Pests. Fruit flies: Their biology, natural enemies and control. pp. 345-350. Elsevier Science.
- Sivinski, J.; Aluja, M.; et al. 1999. Topics in the evolution of sexual behavior in the Tephritidae, pp751-792. Em: Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior. M. Aluja ,M e Norrbom, A.L (eds.).CRC Press, Boca Ratón.

- Siwicki, K. K.; Eastman, C.; Petersen, G.; Rosbash, M.; Hall, J. C. 1988. Antibodies to the period gene product of *Drosophila* reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. *Neuron*, 1, 141–150.
- Snook, R. R.; Cleland, S. Y.; Wolfner, M. F.; Karr, T. L. 2000. Offsetting effects of *Wolbachia* infection and heat shock on sperm production in *Drosophila simulans*: Analyses of fecundity, fertility and accessory gland proteins. *Genetics*, 155, 167-178.
- Sobrinho, I. S. Jr; Brito, R. A. 2010. Evidence for positive selection in the gene *fruitless* in *Anastrepha* fruit flies. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 293.
- Song, H. J.; Billeter, J. C.; et al. 2002. The *fruitless* gene is required for the proper formation of axonal tracts in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. *Genetics*, 162, 1703-1724.
- Stockinger, P.; Kvitsiani, D.; et al. 2005. Neural circuitry that governs *Drosophila* male courtship behavior. *Cell*, 121, 795-807.
- Sugayama, R. L.; Malavasi, A. 2000. Ecologia Comportamental, pp. 99-108. em: Malavasi A, Zucchi RA, (eds.) Moscas–das–frutas de Importância Econômica no Brasil Conhecimento Básico e Aplicado.. Holos Editora, Ribeirão Preto.
- Szrajer, M. R. 2011. Caracterização e análise da região codificadora do gene *fruitless* em moscas-das-frutas (*Anastrepha obliqua*). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Tian, M.; Maniatis, T. 1993. A “splicing” enhancer complex controls alternative “splicing” of *doublesex* pre-mRNA. *Cell*. 74:105-114.
- Ustinova, J. ; Mayer, F. 2006. Alternative starts of transcription, several paralogues, and almost-fixed interspecific differences of the gene *fruitless* in a hemimetabolous insect. *Jornal of Molecular Evolution*. 63, 788–800.
- Usui-Aoki, K.; et al. 2000. Formation of the male-specific muscle in female *Drosophila* by ectopic *fruitless* expression. *Nature Cell Biology*, 2, 500–506.

- Valcárcel, J.; Singh, R.; Zamore, P. D.; Green, M. R. 1993. The protein Sex-lethal antagonizes the "splicing" factor U2AF to regulate alternative "splicing" of transformer pre-mRNA. *Nature*. 362, 171-175.
- Vera, M. T.; Cáceres, C.; Wornoayporn, V.; Islam, A.; Robinson, A. S.; de la Veja, M. H.; Hendrichs, J.; Cayol, J.P. 2006. Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera, Tephritidae). *Annals of Entomological Society of America USA*, 99, 387-397.
- von Schlichtet, F.; Hall, J. C. 1979. Neural topography of courtship song in sex mosaics of *Drosophila melanogaster*. *Journal of comparative physiology*, 129, 85-95.
- Vosshall, L. B.; Price, J. L.; Sehgal, A.; Saez, L.; Young, M. W. 1994. Block in nuclear localization of 'period' protein by a second clock mutation, 'timeless.' (circadian clock) (Cover Story). *Science*, 263, 1606-1610.
- Zar, J. H. 1999. Biostatistical analysis. Prentice Hall; Upper Saddle River, NJ, 4.
- Zucchi, R. A. 2008. Fruit flies in Brazil: *Anastrepha* species and their host plants and parasitoids. Disponível em: <www.lea.esalq.usp.br/anastrepha/>. Acesso em: 23 de Abril de 2012.