Pietro Enrico Vicari Vento

Efeitos do silenciamento gênico de *transformer-2* a
partir da aplicação de RNAi parental em
Anastrepha sp.1 *affinis fraterculus* (Diptera,
Tephritidae)

Effects of *transformer-2* gene silencing by parental
RNAi in *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus*
(Diptera, Tephritidae)

São Paulo

2016

Pietro Enrico Vicari Vento

Efeitos do silenciamento gênico de *transformer-2* a
partir da aplicação de RNAi parental em
Anastrepha sp.1 *affinis fraterculus* (Diptera,
Tephritidae)

Effects of *transformer-2* gene silencing by parental
RNAi in *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus*
(Diptera, Tephritidae)

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Biologia (Genética).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Denise
Selivon

São Paulo

2016

Vicari, Pietro Enrico

Efeitos do silenciamento gênico de *transformer-2* a partir da aplicação de RNAi parental em *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus* (Diptera, Tephritidae)

70 páginas

Dissertação (Mestrado) – Versão Corrigida. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. A versão original se encontra disponível no IB-USP.

1. moscas-das-frutas 2. determinação sexual 3. pseudomacho I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof^a. Dr.^a. Denise Selivon Scheepmaker

Orientadora

Para meu pai
pelo carinho, pelo apoio
e principalmente pela inspiração com sua história.

*“Não há fatos eternos, assim como
não há verdades absolutas”.*

(Friedrich Nietzsche)

Agradecimentos

Agradeço a Prof.^a Denise Selivon,
por ter estado sempre presente me proporcionando uma excelente orientação,
tanto na academia quanto na vida.

Ao Prof. André,
por seu fundamental papel me ensinando tanto do que eu aprendi ao longo desses
anos de formação.

A Ester,
por sua amizade, companheirismo e pela sua participação nas etapas iniciais e
concepção deste projeto.

Ao Dr. Lucas Sánchez,
pela proveitosa discussão do trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Ighor, Paula, Fernando e Rebeca além de todos
os colegas que passaram pelo laboratório ao longo desses anos,
pelo apoio durante o dia-a-dia, pela companhia, pelos cafés durante a tarde e
principalmente pelo incentivo e pela amizade.

A D.^a Elzy,
por propiciar as condições necessárias para o desenvolvimento do trabalho,
mantendo a criação das moscas, além de estar sempre disposta a ajudar.

A Fernanda,

por todo seu amor, carinho e incentivo nesses anos ao meu lado, e também pela sua paciência e compreensão nos momentos de ausência que se refletiram em apoio e ajuda durante várias noites e finais de semanas no laboratório.

A minha família e amigos,

pelo carinho e incentivo e por estarem sempre ao meu lado.

Ao departamento de Genética e Biologia Evolutiva e ao Instituto de Biociências,
e todo seu pessoal,

por terem provido todos os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho

Apoio financeiro,
Bolsa institucional de mestrado – CNPq

Índice

Resumo	10
Abstract	11
I - Introdução	12
II – Objetivos	20
III – Materiais e Métodos	21
III.1 Teste de transferência de dsRNA da fêmea parental para sua progênie	21
III.1.1 Padronização técnica	21
III.1.2 Injeção de <i>transformer-2</i> dsRNA na fêmea parental	22
III.1.3 Análise do cariótipo da progênie	23
III.1.4 Análise da proporção sexual da progênie	24
III.2 Caracterização da progênie	25
III.2.1 Obtenção da progênie afetada	25
III.2.2 Produção de pupas e emergência de adultos	26
III.2.3 Testes de fertilidade dos machos	26
III.2.4 Morfologia de estruturas sexuais	28
III.2.5 Assimetria de asas e de cerdas	29
III.2.5.1 Asas	29
III.2.5.2 Cerdas frontais da cabeça	30
IV - Resultados	32
IV.1 Teste de transferência de dsRNA da fêmea parental para sua progênie	32
IV.1.1 Padronização técnica	32
IV.1.2 Injeção de <i>transformer-2</i> dsRNA na fêmea parental	34
IV.1.3 Análise do cariótipo da progênie	35

IV.1.4	Análise da proporção sexual da progênie	36
IV.2	Caracterização da progênie	39
IV.2.1	Obtenção da progênie afetada	39
IV.2.2	Produção de pupas e emergência de adultos	42
IV.2.3	Testes de fertilidade dos machos	43
IV.2.4	Morfologia de estruturas sexuais	44
IV.2.5	Assimetria de asas e de cerdas	46
IV.2.5.1	Asas	47
IV.2.5.2	Cerdas frontais da cabeça	47
V-	Discussão	49
VI -	Conclusões	59
VII-	Referências Bibliográficas	61

Resumo

As moscas-das-frutas são pragas da fruticultura mundial, sendo que a espécie de maior importância econômica na região Neotropical é *Anastrepha fraterculus*. Estudos anteriores mostraram que o silenciamento da expressão de genes envolvidos no processo de determinação sexual, como o *transformer-2*, constitui uma potencial ferramenta a ser aplicada em programas de controle que requerem a produção de machos em larga escala. Em estudos prévios o dsRNA foi injetado diretamente nos embriões, o que, entretanto, implica em altas taxas de mortalidade durante o processo. Aqui nós descrevemos os efeitos do silenciamento gênico de *transformer-2* pela injeção de dsRNA no abdome de fêmeas parentais de *A. sp.1 affinis fraterculus*, com o intuito de verificar se o silenciamento gênico ocorre em sua progênie. As fêmeas tratadas foram cruzadas com machos não tratados. Sua progênie foi coletada durante cinco semanas e analisada quanto (a) proporção sexual, (b) presença de pseudomachos (XX), (c) fertilidade dos machos, (d) morfologia sexual, (e) emergência e (f) assimetria de asas e cerdas frontais da cabeça. A análise da proporção sexual revelou um desvio significativo da proporção de 1:1 entre as semanas 1 a 3, a favor dos machos. A análise de cariótipo revelou a presença de pseudomachos (XX). A maioria dos indivíduos apresentaram morfologia das estruturas sexuais normal, exceto por um pequeno número de indivíduos que tinham testículos assimétricos. Os testes de fertilidade revelaram que todos os machos possuíam espermatozoides móveis em seus testículos, mas algumas fêmeas, correspondentes aos cruzamentos estéreis, não tinham espermatozoides em suas espermatecas. As taxas de emergência dos adultos a análise da assimetria de asas mostraram que não há diferenças significativas em relação ao controle. Entretanto houve aumento significativo na assimetria das cerdas frontais da cabeça. Os resultados indicam que as progênies das fêmeas tratadas foram afetadas pelo silenciamento de *transformer-2*. Além disso, as análises de morfologia e de assimetria sugeriram que o tratamento causou perturbação na ontogenia das progênies, semelhante ao verificado na injeção feita diretamente nos ovos. Por fim, os testes de fertilidade mostraram que alguns machos da progênie são incapazes de transferir espermatozoides para as fêmeas, provavelmente os pseudomachos (XX). A produção de uma progênie com uma maior quantidade de machos a partir da interferência na expressão de um único gene pode ser útil para aprimorar o manejo da produção de machos em biofábricas.

Abstract

Fruit flies are worldwide fruticulture pests, and the species of greatest economic importance in Neotropics is *Anastrepha fraterculus*. Previous studies showed that silencing genes involved in sex determination of *Anastrepha*, such as *transformer-2*, are potential tools to be used in control programs that require male production in a large scale. In previous works dsRNA was injected directly in embryos, which, however, causes high mortality rates during the process. Herein we describe the effects of *transformer-2* gene silencing by injection of the dsRNA in the abdomen of parental females of *A. sp.1 affinis fraterculus*, to verify whether gene silencing occurs in the progenies. The injected females were crossed to non-treated males. Their progeny were recovered during five weeks and analysed as to (a) sex ratio, (b) presence of pseudomales (XX), (c) fertility of males, (d) sex morphology, (e) emergence and (f) asymmetry of wings and head setae. Sex ratio analysis showed a significant deviation of 1:1 in weeks 1 to 3, in favour of males. Karyotype analysis revealed presence of pseudomales (XX). The most of flies exhibited normal morphology of sexual structures, except by a few individuals having asymmetric testes. Fertility tests showed that all males had motile spermatozooids in their testes, but some females from sterile crosses had no spermatozooids in their spermathecae. Adult emergence rates and wing asymmetry analysis showed that there are no significant differences in relation to control. However, there was a significant increase in asymmetry of head setae. The results indicate that the progenies from treated females were affected by silencing of the *transformer-2*. Besides, asymmetry and morphological analysis suggested that the treatment caused noise in the ontogeny of progenies, similarly to injection directly in eggs. Finally, fertility tests showed that some males of progeny are unable to transfer spermatozooids to females, probably being the pseudomales ones (XX). The production of a male enriched progeny, by interference in expression of a single gene, could be useful to improve the management of male production in biofabrics.

I - Introdução

As moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae) são insetos que tem o hábito de colocar seus ovos diretamente no interior de frutos em amadurecimento, daí o nome como são conhecidas. As larvas eclodem no interior destes e ali se desenvolvem alimentando-se de sua polpa ou sementes. Isso danifica os frutos, além de causar seu apodrecimento precoce e de permitir a entrada de diversos patógenos através dos orifícios por onde foram colocados os ovos. Como alguns de seus hospedeiros são espécies de interesse comercial, algumas espécies de moscas-das-frutas são consideradas pragas da fruticultura mundial causando prejuízos calculados na ordem de milhões de dólares ao redor do mundo. Na região Neotropical a espécie de importância econômica mais relevante é *Anastrepha fraterculus* (*sensu lato*), conhecida como “mosca-das-frutas sul-americana”. Essa espécie apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina e Chile. Trata-se de uma espécie polífaga e altamente adaptável que pode ser encontrada em diferentes ambientes e utilizando diferentes frutos-hospedeiros (MALAVASI *et al.*, 2000).

Há muito tempo que diversos autores vêm associando essa ampla distribuição e diversidade ecológica de *A. fraterculus* com diferenças morfológicas, genéticas, cromossômicas e comportamentais entre populações de diferentes localidades, sugerindo que, na verdade, essa espécie nominal se trataria de um complexo de espécies crípticas (STONE, 1942; BAKER *et al.*, 1944; MENDES, 1958; BUSH, 1962; MORGANTE *et al.*, 1980; SOLFERINI & MORGANTE, 1987; STECK, 1991; STECK & SHEPPARD, 1993). Entretanto apenas na virada do século, através de análises que se valeram de diferentes metodologias integradas (SELIVON, 1996; SELIVON & PERONDINI, 1998; SELIVON *et al.*, 1999, 2004, 2005), foi possível identificar que no Brasil ocorrem pelo menos três espécies de *A. fraterculus* (*s.l.*) que são claramente distintas umas

das outras, as quais foram provisoriamente denominadas como *A. sp.1 affinis fraterculus*, *A. sp.2 aff. fraterculus* e *A. sp.3 aff. fraterculus*. Mais recentemente, análises morfométricas (HERNANDEZ-ORTIZ *et al.*, 2004, 2012, 2015; CANAL *et al.*, 2015) e do marcador molecular ITS1 do DNA ribossômico (PREZOTTO, 2008; SUTTON *et al.*, 2015), revelaram que ao longo da região Neotropical existem na realidade pelo menos oito grupos distintos dentro do complexo *fraterculus* e que inclusive existe incompatibilidade reprodutiva entre certas populações de diferentes regiões (VERA *et al.*, 2006; CÁCERES *et al.*, 2009).

Por se tratar de uma praga de importância econômica que desperta grande interesse na comunidade científica, muitos dos estudos têm se concentrado na caracterização das espécies deste complexo e na compreensão dos mecanismos pelos quais se deu o isolamento entre elas (RULL *et al.*, 2012, 2013; BRÍZOVÁ *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2013; OROÑO *et al.*, 2013; ABRAHAM *et al.*, 2014; DEVESCOVI *et al.*, 2014; FARIA *et al.*, 2014; PERRE *et al.*, 2014). Além destes também é reconhecida a importância de estudos sobre aspectos básicos da biologia desses organismos, como sobre a determinação do sexo em nível molecular nas espécies do complexo (RUIZ *et al.*, 2005, 2007a, 2007b; SARNO *et al.*, 2010).

Determinação do sexo se refere à regulação e evolução do desenvolvimento de características sexuais, que resultam em dimorfismos sexuais que desempenham importante papel na evolução e no comportamento animal. Diferentes genes e mecanismos regulatórios estão envolvidos nos sistemas de determinação sexual para estabilizar o desenvolvimento dos fenótipos masculino e feminino em diferentes espécies (SÁNCHEZ, 2008; GEMPE & BEYE, 2011). O conhecimento dos mecanismos de determinação sexual em tefritídeos ainda é recente, em parte devido às dificuldades experimentais associadas a insetos que não são organismos modelo. Mas, graças aos avanços tecnológicos, algumas ferramentas, como a técnica de RNA interferente ou de insetos transgênicos,

permitiram que esses trabalhos fossem conduzidos e hoje há uma hipótese completa de determinação sexual genética em tefritídeos (Figura 1).

No gênero *Anastrepha* o gene *transformer* (*tra*) fornece o dispositivo de memória da determinação sexual através de sua função auto-regulatória, sendo que apenas as fêmeas traduzem uma proteína Tra funcional (RUIZ *et al.*, 2007). Como em outras espécies de insetos, a proteína Tra age em conjunto com o produto do gene *transformer-2* (*tra-2*) no controle do *splicing* sexo-específico do transcrito do gene *doublesex* (*dsx*) (RUÍZ *et al.*, 2007a; SARNO *et al.*, 2010) que dá origem a uma proteína típica de fêmeas DsxF.

Nos machos a proposta que se tem é que, devido a ação de um fator masculinizante (ou fator M) de natureza ainda não caracterizada, associado ao cromossomo Y, há o *splicing* alternativo do gene *tra*, que leva a produção de um transcrito de RNAm com códon de término da tradução precoce que resulta na expressão de uma proteína Tra não funcional (RUIZ *et al.*, 2007a). Na ausência da proteína Tra, não há formação do complexo proteico com a proteína Tra-2 (RUÍZ *et al.*, 2007a; SARNO *et al.*, 2010), o que faz que o gene *dsx* siga seu padrão de *splicing* padrão, que dá origem a uma proteína específica de machos, a DsxM. As proteínas DsxM e DsxF são fatores de transcrição que regulam a expressão dos genes de citodiferenciação sexual (RUÍZ *et al.*, 2005, 2007b), que levam um embrião a seguir o desenvolvimento dos fenótipos masculino ou feminino.

O produto Tra-2 atua não só no *splicing* sexo-específico de *dsx*, mas também no *splicing* específico do gene *tra* (SARNO *et al.*, 2010). Hoje também se conhece a importância das proteínas Tra e Tra-2 maternas que, nas fêmeas, promovem o *splicing* sexo-específico do gene *tra* durante os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário (SARNO *et al.*, 2010). O fator M dos machos atuaria nos embriões de modo a impedir que se estabelecesse a função auto-regulatória de *tra* e *tra-2*.

Hipótese de determinação sexual em Tephritidae*

Figura 1 - Hipótese atual do funcionamento da cascata genética de determinação sexual em Tephritidae (Diptera).

* modificado de Sarno e col. (2010)

Em um dos trabalhos que contribui para a elucidação dessa cascata de regulação genética de determinação sexual em moscas-das-frutas foi feito o estudo da função gênica de *tra-2*, através de aplicação de dsRNA de *tra-2* feita diretamente nos embriões de *A. sp.1 aff. fraterculus* (SARNO *et al.*, 2010). Foi verificado que o grupo tratado apresentava a proporção sexual enviesada a favor de machos. Além disso verificou-se que o silenciamento gênico acarreta uma

alteração do padrão de *splicing* dos genes *tra* e *dsx* nas fêmeas, que passam a ser processados com o padrão típico de machos. Por isso indivíduos que são fêmeas genóticas (XX) acabam por desenvolver o fenótipo masculino, os chamados pseudomachos – indivíduos com fenótipo masculino, mas que possuem os cromossomos sexuais femininos (XX) (SARNO *et al.*, 2010).

Em realizações semelhantes envolvendo outras espécies de tefritídeos, como *A. suspensa* (SCHETELIG *et al.*, 2012) e *Bactrocera dorsalis* (LIU *et al.*, 2015) foi registrado que a partir da injeção de dsRNA de *tra* e *tra-2* juntos nos embriões há a formação de um grupo composto apenas por machos. Nesses casos também foi detectada a presença de pseudomachos (XX), sendo que esses indivíduos foram identificados, através de diferentes estratégias, como pela análise de seu cariótipo (SARNO *et al.*, 2010), uso de um marcador fluorescente ligado ao Y (SCHETELIG *et al.*, 2012) ou análise de descendência (LIU *et al.*, 2015).

Outro efeito comum relatado nesses trabalhos foi o fato de esses pseudomachos apresentarem as estruturas sexuais internas com alterações, como alterações no grau de desenvolvimento das gônadas de um mesmo indivíduo (SARNO *et al.*, 2010; SCHETELIG *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2015), podendo inclusive ser assimétricas, e a presença de estruturas sexuais internas de machos e de fêmeas em mosaico (SARNO *et al.*, 2010). Além disso, detectou-se que em *Anastrepha suspensa* (SCHETELIG *et al.*, 2012) todos esses indivíduos pseudomachos eram estéreis, apesar de produzirem espermatozoides móveis. O mesmo não é válido para outras espécies de tefritídeos como *Ceratitis capitata* (SACONE *et al.*, 2007) e de *Bactrocera dorsalis* (LIU *et al.*, 2015) sendo que nesses casos os indivíduos pseudomachos (XX) eram férteis.

Um dos efeitos mais conspícuos do silenciamento gênico de *transformer* e/ou *transformer-2* por aplicação de dsRNA em embriões é a transformação de fêmeas genóticas em machos fenotípicos (pseudomachos XX), que resulta no desenvolvimento de um grupo com maior frequência de machos, sendo que em

alguns casos essa frequência é próxima de 100% (SCHETELIG *et al.*, 2012). Essa produção de uma maior quantidade de machos logo chamou atenção por seu potencial de aplicação em biofábricas, onde há produção de uma grande quantidade de machos a serem liberados no campo para o controle populacional da espécie, como na técnica do inseto estéril (TIE) e na técnica do inseto incompatível (TII). Caso fosse possível produzir uma progênie composta apenas por machos haveria otimização da produção de moscas em biofábricas. O uso de dsRNA de *tra* e/ou *tra-2* pode contribuir para esse fim, entretanto com a metodologia empregada nesses trabalhos (SACCONE *et al.*, 2007; SALVEMINI *et al.*, 2009; SARNO *et al.*, 2010; SCHETELIG *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2015), sua utilização é bastante improvável. Isso por que a técnica de injeção de dsRNA diretamente nos embriões desses tefritídeos além de consistir em uma metodologia trabalhosa resulta em uma altíssima mortalidade ao procedimento: menos de 5% dos indivíduos tratados chegam a vida adulta (SARNO *et al.*, 2010) o que revela um rendimento muito baixo.

Entretanto existem modificações da técnica de RNAi que podem ser utilizadas como alternativas para se obter um rendimento melhor. Nesse contexto surge a possibilidade de se utilizar a técnica de RNAi parental (pRNAi). No pRNAi o dsRNA é introduzido da cavidade corporal de uma fêmea parental, adulta e fértil. As moléculas de dsRNA circulantes na hemocele/hemolinfa então são incorporados nos ovócitos em desenvolvimento, o que causa o silenciamento gênico na progênie derivada desses ovócitos. Entre as principais vantagens da utilização desta técnica estão a otimização do procedimento de injeção, uma vez que a partir de uma única injeção no parental uma grande parte de sua progênie apresenta os efeitos do silenciamento gênico (KHILA & GRÍBC, 2007), aumentando em várias ordens de magnitude o efeito do silenciamento gênico, e também o fato de que, nesse caso, o silenciamento é feito em um momento anterior do desenvolvimento, na fase de ovócito e não no embrião em início de

desenvolvimento (BUCHER *et al.*, 2002), o que é fundamentalmente importante no caso da expressão de proteínas que são herdadas da mãe.

A transferência de moléculas de dsRNA da cavidade corporal de fêmeas para seus ovócitos causando o silenciamento gênico de sua progênie foi primeiramente descrito em *Ceanorhabditis elegans* (FIRE *et al.*, 1998) e no coleóptero *Tribolium castaneum* (BUCHER *et al.*, 2002). Depois esse método passou a ser utilizado em vários organismos (LIU & KAUFMAN, 2005; LYNCH & DESPLAN, 2006; MARQUES-SOUZA *et al.*, 2008; KHAJUIRA *et al.*, 2015), incluindo o tefritídeo *Bactrocera dorsalis* (CHEN *et al.*, 2007), e para o estudo da função de diversos genes, incluindo genes relacionados ao processo de determinação sexual, como o *transformer* (SHUKLA & PALI, 2012). Mas até o momento a exequibilidade desse método não foi demonstrado para espécies de *Anastrepha*.

Os efeitos do silenciamento gênico de *tra-2* feito por esse método podem não ser os mesmos do que os verificados no silenciamento gênico feito nos embriões, uma vez que a proteína Tra-2 herdada da mãe tem papel no processo de determinação e desenvolvimento de características sexuais desses organismos. No caso do silenciamento feito por pRNAi a ausência da proteína Tra-2 materna nos ovócitos poderia gerar alterações maiores ou mais profundas do que aquelas verificadas quando da injeção feita no embrião. Assim esse tipo de realização poderia adicionar informações sobre os efeitos deste gene, além de propiciar que o silenciamento gênico seja feito em uma etapa mais adequada para o estudo de sua função.

Além disso, estudos recentes vêm associando o que se conhece sobre os mecanismos de determinação sexual de outras espécies de tefritídeos a técnicas de engenharia genética (DAFFA'ALLA *et al.*, 2010; SCHETELIG & HANDLE, 2012; OGAUGWU, *et al.*, 2013) visando a melhoria de estratégias de controle destas pragas, e as estratégias que envolvem a utilização da tecnologia de RNAi também vem ganhando destaque no contexto de controle populacional de insetos-

praga (PRICE & GATEHOUSE, 2008; GU & KNIPPLE, 2013). Nesse contexto o silenciamento de um gene envolvido no processo de determinação sexual em *Anastrepha*, como é o caso do *tra-2*, a partir da injeção de dsRNA na fêmea parental serviria como demonstração da ocorrência da transferência de moléculas de dsRNA do parental para a sua progênie, o que abriria possibilidade para que fossem desenvolvidas estratégias de produção de progênie com maior número de machos em biofábricas.

Por fim, ainda pensando na efetividade da possível utilidade da manipulação do gene *tra-2* para a produção de machos em biofábricas, sabe-se que medidas de assimetria flutuante (AF) podem ser utilizadas como indicadores tanto de perturbação no desenvolvimento ontogenético de tefritídeos (SOUZA *et al.*, 2007) quanto da capacidade de competição por cópulas, uma vez que no ambiente natural ocorre seleção dos machos pelas fêmeas a favor de machos simétricos (HUNT *et al.*, 2004). Por isso testar os possíveis indivíduos da progênie produzidos através deste método quanto a esse fator também é importante, uma vez que é desejável que indivíduos produzidos em biofábricas sejam o mais semelhantes quanto possível dos indivíduos selvagens, e também que sejam capazes de se acasalar, para o sucesso da TIE ou TII.

II – Objetivos

Testar as alterações fenotípicas verificadas na progênie a partir do silenciamento gênico de *transformer-2* feito por injeção parental de *Anastrepha transformer-2* dsRNA (pRNAi) em *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus*.

Objetivos específicos:

Em um primeiro momento pretende-se verificar a eficácia da técnica de pRNAi em gerar o silenciamento gênico de *transformer-2*. Para isso o dsRNA será aplicado e, para confirmar o silenciamento gênico, a progênie será analisado quanto:

1. Proporção sexual;
2. Presença de pseudomachos (XX);

Em uma segunda etapa pretende-se avaliar efeitos do gene *transformer-2* em *A. sp.1 aff. fraterculus*, através da análise da progênie quanto à:

3. Produção de pupas e adultos;
4. Fertilidade dos machos;
5. Morfologia de estruturas sexuais dos adultos;
6. Assimetria das asas e cerdas frontais da cabeça;

III – Materiais e Métodos

III.1 Teste de transferência de dsRNA da fêmea parental para sua progênie

III.1.1 Padronização técnica

O *transformer-2* dsRNA utilizado foi obtido de acordo com metodologia descrita por Sarno e col. (2010), e dissolvido em solução tampão de injeção (5mM KCl, 0,1 mM NaH₂PO₄, pH 6,8) em três diferentes concentrações: 1,8 µg/µL, 1,2 µg/µL e 0,6 µg/µL. As moscas utilizadas foram retiradas de uma colônia de *A. sp.1 aff. fraterculus* de laboratório já caracterizada (oriunda de Poços de Caldas/MG-Brasil - 21°47'16''S, 46°33'41''O), mantida segundo metodologia padronizada (SELIVON, 1996). Dessa colônia foram retirados grupos de 10 fêmeas adultas em idade reprodutiva, que foram isoladas e posteriormente injetadas com soluções de *transformer-2* dsRNA nas concentrações acima mencionadas ou tampão de injeção puro (controle); sendo que cada uma destas foi injetada em cada um dos seguintes volumes: 1,0 µL, 0,7µL e 0,5 µL; totalizando assim 12 grupos que foram utilizados em testes de sobrevivência ao procedimento de injeção.

Essas moscas foram anestesiadas a frio e então, seguindo protocolo descrito para *D. melanogaster* (DZITOEVA *et al.*, 2001, modificado), uma agulha de vidro acoplada a uma mangueira de látex, foi utilizada para injetar o *transformer-2* dsRNA, em volumes e concentrações acima citados, no abdome desses indivíduos, na região da pleura, na altura entre o terceiro e o quarto segmento abdominal. O procedimento se deu sob estereomicroscópio e sobre placa de gelo, para manter as moscas anestesiadas. Após a injeção as fêmeas foram

devolvidas para gaiolas de criação. Considerou-se como sobreviventes aquelas fêmeas que estavam vivas decorridas 24 horas do procedimento de injeção intra-abdominal. Com base nesses resultados foi determinada a concentração e o volume de material utilizado para testar a ocorrência da transferência de RNAi do parental para a progênie em *Anastrepha*, com base na sobrevivência do parental e quantidade de *transformer-2* dsRNA injetado.

III.1.2 Injeção de *transformer-2* dsRNA na fêmea parental

Foram isolados em gaiola adequada para manutenção em laboratório três grupos de 100 indivíduos adultos recém-emergidos cada, sendo 50 machos e 50 fêmeas, da mesma colônia utilizada para os testes da padronização técnica. A estes grupos de indivíduos foram fornecidos diariamente substratos para oviposição - hemi-esferas de ágar 2% coradas por solução de anilina 1% (BÖLLER, 1968, modificado) e envoltas por Parafilm® - como forma de determinar o momento em que começaram a colocar ovos, indicativo de sua maturidade sexual. Então, antes de aplicar qualquer tratamento experimental, foi fornecido um fruto para oviposição, que foi coletado e mantido até a emergência dos adultos. Isto corresponde a um controle interno (CI), utilizado como forma de testar se a proporção sexual inicial da progênie, antes da injeção do dsRNA, era de 1:1. Além disso, esse controle não foi considerado em nenhuma outra análise.

Após esse procedimento as fêmeas, seguindo metodologia descrita no item III.1.1, foram injetadas com solução de *transformer-2* dsRNA, em concentração e volume previamente determinados (grupo experimental ou EXP), ou com tampão de injeção (grupo controle de tratamento ou CT) ou simplesmente não receberam nenhum tipo de tratamento (controle geral ou CG). Depois de injetadas, as fêmeas foram recolocadas nas

gaiolas de criação com os machos e semanalmente foram fornecidos frutos para oviposição. Os frutos contendo os ovos que compunham sua progênie foram recolhidos em amostras semanais coletadas durante 5 semanas após a injeção (semanas 1-5: S1-S5). Durante essas 5 semanas em que o experimento transcorreu também foi verificada a mortalidade das fêmeas parentais ao longo do tempo, como forma de detectar possíveis efeitos a longo prazo na mortalidade causados pelo procedimento de injeção abdominal e/ou pela aplicação das moléculas de *tra-2* dsRNA.

III.1.3 Análise do cariótipo da progênie

Conforme descrito por Selivon (1996), é possível identificar o sexo de larvas de espécies do complexo *Anastrepha fraterculus*. Isso é possível graças às diferenças morfológicas encontradas nas pré-gônadas de larvas a partir do terceiro estágio e nas células de tecido adiposo associadas a essas estruturas. Os machos apresentam pré-gônada grande e hialina e está associada a trabéculas de células do tecido adiposo sem disposição característica (Figura 2b). Já as fêmeas apresentam pré-gônada pequena e de difícil visualização, mas com células de gordura apresentando uma conspícua e característica organização em forma de roseta em torno da região da pré-gônada feminina (Figura 2a).

Com isso em vista, indivíduos das progênies de EXP, CT e CG foram separados das amostras S1 e S3, na fase de larva de terceiro estágio. Eles foram dissecados em solução de Ringer (solução fisiológica de insetos) e tiveram a região da pré-gônada analisada para a determinação do sexo. Os indivíduos foram sendo dissecados até que se completasse a identificação de 10 machos em cada uma dessas amostras, totalizando 20 machos para cada tratamento. Então as larvas que foram identificadas como machos tiveram o gânglio neural removido e utilizados para fazer

preparações com o intuito de visualizar divisões mitóticas e identificar sua constituição cromossômica (SELIVON & PERONDINI, 1997). Os gânglios neurais foram removidos e imersos em solução hipotônica (citrato de sódio 0,2%) por 4 minutos e então transferidos para solução metanol:ácido acético (3:1) por 45 minutos. Após isso foram transferidos para lâmina contendo uma gota de ácido acético 60%, e o gânglio neural foi dissociado manualmente. Após secagem ao ar a lâmina foi lavada em tampão fosfato e corada (Giemsa 5%, tampão fosfato, pH 6,8).

Figura 2 - Pré-gônadas de larvas de 3º estágio de *A. sp.1 aff. fraterculus* (a) região de pré-gônada feminina, indicada na seta e (b) pré-gônada masculina, indicada na seta. As barras são iguais a 100 μ m.

III.1.4 Análise da proporção sexual da progênie

Sabe-se que o silenciamento gênico de *transformer-2* em *A. sp.1 aff. fraterculus*, a partir da aplicação de dsRNA em embriões, leva ao desenvolvimento de uma maior frequência de machos e ao desenvolvimento de pseudomachos, que são fêmeas genotípicas que se

desenvolvem com o fenótipo masculino (SARNO *et al.*, 2010). Espera-se que o mesmo seja encontrado na presente abordagem.

Para analisar os desvios esperados na proporção sexual das progênes de cada tratamento estas foram mantidas até a emergência dos adultos e o número de machos e de fêmeas foi registrado e em seguida foi aplicado o teste χ^2 com a correção de Yates considerando a hipótese-nula de que a proporção sexual entre machos e fêmeas é 1:1 ($\alpha = 0,05$, valor mínimo do teste para rejeitar hipótese nula = 3,85). A análise foi feita considerando tanto o total de indivíduos das progênes quanto considerando cada semana após a injeção de dsRNA separadamente (S1-S5). Em todos os casos os indivíduos analisados quanto ao cariótipo foram considerados também na análise da proporção sexual das progênes.

III. 2 Caracterização da progênie

III.2.1 Obtenção da progênie afetada

Uma vez confirmada a capacidade de se produzir pseudomachos na progênie de fêmeas parentais tratadas com *tra-2* dsRNA seguiu-se com a caracterização dessa progênie. Para isso três amostras experimentais adicionais (A, B e C), também de 100 indivíduos cada, sendo 50 machos e 50 fêmeas, foram tratadas com *tra-2* dsRNA, seguindo metodologia descrita nos itens III.1.1 e III.1.2, além de um tratamento controle (CONT) que não recebeu qualquer tratamento experimental.

Antes de se prosseguir com a caracterização da progênie foram feitos os testes necessários para confirmar o sucesso do silenciamento gênico de *transformer-2*. Para isso, dois lotes de 20 machos recém-emergidos de cada amostra (A, B, C e CONT) foram coletados, um em S1 e o outro em S3 (20/20), totalizando 40 machos por amostra. Seguindo

metodologia descrita por Selivon e Perondini (1997), estes machos foram dissecados em solução isotônica (Ringer de inseto) e tiveram seus testículos removidos e transferidos para uma solução de citrato de sódio 0,2% por durante 10 minutos, sendo então transferidos para uma lâmina histológica e corados com orceína-acética 2% por durante 30 minutos e então esmagado entre lâmina e lamínula para se proceder com a observação dos lotes cromossômicos. Estes machos tinham, no máximo, dois dias de idade de forma a garantir que as preparações apresentassem ainda quantidade considerável de mitoses pré-meióticas. A análise da proporção sexual seguiu-se como descrito no item III.1.4.

III.2.2 Produção de pupas e emergência de adultos

Para cada amostra, antes de os adultos emergirem, a quantidade de pupas produzidas foi registrada. Posteriormente foram registradas também as quantidades de adultos que emergiram e assim calculou-se a frequência (%) de emergência.

Os valores de emergência de cada amostra foram comparados com os valores verificados para o grupo controle, a fim de verificar se havia diferenças significativas. Para isso seguiu-se com o teste χ^2 com a correção de Yates entre a frequência de emergência dos grupos experimentais e o grupo controle, sendo que as diferenças são significativas a $p < 0,05$. Essas análises foram feitas através do *software* Statistica 10 (STATSOFT INC., 2011).

III.2.3 Testes de fertilidade dos machos

A fim de analisar a fertilidade dos machos das progênes, foram coletados dois lotes de 20 machos virgens cada, coletados nas semanas S1

e S3 das amostras A, B, C e CONT, resultando assim em 40 machos para cada amostra. Esses machos foram mantidos até que atingissem idade entre 15-17 dias, quando foram colocados individualmente com três fêmeas virgens férteis de mesma idade e oriundas do estoque, que não receberam qualquer tipo de tratamento, em caixas de cruzamentos para que pudessem copular (SCHETELIG *et al.*, 2012). Cada uma dessas caixas de cruzamentos foi observada diariamente (3 horas por dia, das 8h até às 11h), por durante duas semanas.

Durante estes testes cinco fatores foram analisados: (a) ocorrência de cópulas, (b) sobrevivência dos machos durante o período de observação, (c) fertilidade/esterilidade dos machos, (d) presença de espermatozoides móveis nos testículos dos machos e (e) nas espermatecas das fêmeas, como indicativo da capacidade de transferência de espermatozoides para as fêmeas.

A cada semana foram fornecidos substratos naturais para a oviposição (frutos). Esses frutos foram coletados e mantidos até a emergência da geração F₂, para verificar a presença ou a ausência de progênie, e também os tipos sexuais verificados (machos e/ou fêmeas), como forma de determinar a fertilidade desses machos e de possíveis pseudomachos férteis.

Após as cópulas os machos foram dissecados sob estereomicroscópio e analisados quanto à morfologia geral das gônadas e genitália externa e armazenados em álcool 70% para posterior análise de morfometria das asas e assimetria de cerdas. A fim de determinar se ocorre a produção de espermatozoides móveis nos machos utilizados nesses testes de fertilidade seus testículos foram levemente esmagados entre lâmina e lamínula em uma gota de solução isotônica (Ringer de inseto), e então essas preparações foram analisadas em microscopia de fase para observação dos espermatozoides *in vivo*.

Concomitantemente, como forma de avaliar a eficiência da transferência de espermatozoides dos machos F_1 , as fêmeas utilizadas nos testes de fertilidade foram dissecadas e tiveram suas espermatecas removidas e esmagadas em uma gota de Ringer de inseto entre lâmina e lamínula para sua visualização *in vivo*, a fim de determinar a presença ou a ausência de espermatozoides nas espermatecas. Cruzamentos foram considerados como sem transferência de esperma caso não tenha sido encontrado espermatozoides em nenhuma das três espermatecas de nenhuma das três fêmeas analisadas, por amostra.

As proporções de indivíduos que apresentaram (a) cópulas, (b) sobrevivência, (c) esterilidade, (d) espermatozoides móveis e (e) transferência de espermatozoides para as fêmeas coletadas nesses testes foram comparadas entre os grupos experimentais (A, B e C) e o grupo controle (CONT) através do teste exato de Fisher feito pelo *software* Statistica 10 (STATSOFT INC., 2011).

III.2.4 Morfologia de estruturas sexuais

Os mesmos lotes de machos utilizados no item III.2.3 foram analisados quanto a morfologia de estruturas sexuais (antes de terem seus testículos esmagados para observação dos espermatozoides), além de lotes de fêmeas compostos da mesma forma (20 de S1 + 20 de S3) de cada amostra (A, B, C e CONT). Estes indivíduos foram analisados sob estereomicroscópio quanto ao aspecto geral da terminália, que é a única estrutura sexual externa dimórfica encontrada em espécies de *Anastrepha* (WHITE & ELSON-HARRIS, 1992) e em seguida foram dissecados para análise geral (cor, forma e tamanho) das gônadas (machos e fêmeas) e espermatecas (fêmeas).

III.2.5 Assimetria de asas e de cerdas

Foi analisada a assimetria de duas estruturas que possivelmente estão relacionadas ao processo de corte e cópula e escolha de parceiros sexuais em moscas-das-frutas: asas e cerdas frontais da cabeça (HUNT *et al.*, 2002). Sabe-se que valores de assimetria flutuante (AF) podem ser utilizados como indicativos de perturbação ontogenética em espécies de *Anastrepha* (PIRES, 2005; SOUZA *et al.*, 2007). Nestas análises foram utilizados lotes de 40 machos de S1 e 40 de S3, que correspondem aos 20 machos utilizados para verificação do cariótipo e 20 utilizados para os testes de fertilidade. Para esses testes optou-se por analisar os lotes coletados em S1 e S3 em separado, pois assim é possível verificar um eventual efeito temporal.

III.2.5.1 Asas

As asas direita e esquerda de cada indivíduo foram retiradas, com auxílio de pinças, e montadas entre lâmina e lamínula (20x20mm) em resina Entellan®. Após a secagem destas preparações, as lâminas foram fotografadas com câmera CCD (Leica IC A) acoplada a um estereomicroscópio Leica MZ 12. As fotografias das asas esquerdas de cada indivíduo foram invertidas para que no teste pudessem ser sobrepostas às respectivas asas direitas. Além disso, todas as imagens foram duplicadas, pois isso faz com que cada imagem seja marcada duas vezes, o que aumenta a acurácia da técnica. Posteriormente, um conjunto de 17 marcos anatômicos homólogos, determinados pelo sistema de venação das asas (Figura 3; PERRE *et al.*, 2014), foi mapeado em cada imagem com uso do *software* TpsDig versão 1.38 (ROHLF, 2006), e então

acessou os valores de assimetria de cada indivíduo através de um teste Procrustes ANOVA realizado com o *software* MorphoJ v. 1.06e (KLINGENBERG, 2011), expressos em distâncias de Procrustes.

Figura 3 – 17 marcos anatômicos homólogos utilizados na análise de assimetria de asas (PERRE *et al.*, 2014). Barra igual a 50 μ m.

III.2.5.2 Cerdas frontais da cabeça

As progênies foram analisadas também quanto à assimetria do conjunto das cerdas frontais da cabeça (Figura 4). Para as análises de assimetria foi registrado o número de cerdas do conjunto frontal, e os valores de assimetria de cada indivíduo foram calculados pela diferença entre o número de cerdas do lado direito e lado esquerdo da cabeça (D-E) (PALMER & STROBECK, 2003).

Diferente das asas, algumas condições podem alterar o padrão de assimetria nessa estrutura (PIRES, 2005; SOUZA *et al.*, 2007). Por isso, antes de se proceder com a comparação entre a assimetria dos diferentes grupos foram feitos testes preliminares necessários para confirmar se o tipo de assimetria em questão era flutuante. Dois testes são empregados para esse fim. O primeiro consiste em comparar o número de cerdas de cada lado da cabeça por um teste-

t pareado, que mostra se a média das diferenças entre os lados (Dif.) é igual a zero, indicando se há diferenças significativas entre os números de cerdas dos dois lados, sendo que na AF isso não ocorre. No segundo teste é calculada a média dos valores de assimetria com sinal, que na AF são próximos de zero; além disso, também é calculada a assimetria (*skewness*) e curtose desses conjuntos de dados, sendo que na AF estes índices são próximos aos valores esperados para uma curva normal. Considera-se que em uma curva normal esses índices têm valores localizados entre -3 e +3 (BULMER, 2012). Fora dessa faixa de variação os dados apresentam um desvio significativo em relação a uma curva normal e não podem ser aproximados por uma normal.

Os valores de assimetria, tanto das asas quanto das cerdas, das semanas S1 e S3 dos grupos experimentais e controle foram submetidos a um teste de variância (teste de Levene) para testar a homogeneidade das amostras, a fim de determinar se eles seriam comparados por um teste paramétrico (ANOVA) ou não-paramétrico (Man-Whitney). Estes testes foram feitos através do Statistica 10 (STATSOFT INC., 2011), e são significativos a $p < 0,05$.

Figura 4 – Conjunto de cerdas frontais da cabeça da *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus*. (A) indivíduo simétrico, com o mesmo número de cerdas dos dois lados da cabeça (4 cerdas do lado esquerdo e 4 do lado direito). (B) indivíduo assimétrico, com números diferentes de cerdas nos dois lados da cabeça (4 cerdas do lado esquerda e 3 do lado direito). Barra em B igual a 25 μ m, válida para A. Imagens cedidas por P. Perre.

IV - Resultados

IV.1 Teste de transferência de dsRNA da fêmea parental para sua progênie

IV.1.1 Padronização técnica

Os testes de sobrevivência ao procedimento de injeção foram feitos com 12 grupos experimentais, correspondentes as diferentes combinações entre as concentrações de (1,8 μ g/ μ L, 1,2 μ g/ μ L, 0,6 μ g/ μ L e tampão de injeção puro) e volumes (0,5 μ L, 0,7 μ L e 1,0 μ L) da solução de *transformer-2* dsRNA injetada. A sobrevivência, expressa em porcentagem (%), nos diferentes grupos está mostrada na tabela I.

Tabela I – Sobrevivência (%) ao procedimento de injeção abdominal.

Volume	Concentração da solução de <i>tra-2</i> dsRNA			
	<i>1,8 μg/μL</i>	<i>1,2 μg/μL</i>	<i>0,6 μg/μL</i>	<i>Tampão</i>
<i>1,0 μL</i>	0%	50%	70%	70%
<i>0,7 μL</i>	30%	70%	70%	80%
<i>0,5 μL</i>	50%	80%	80%	80%

Estes resultados sugerem que a sobrevivência varia tanto com (a) a concentração de *transformer-2* dsRNA aplicada quanto com (b) o volume de material injetado, inclusive no caso do grupo controle. Como forma de analisar os efeitos da concentração do RNA interferente levando em conta a variação causada pelo volume, foi elaborado um gráfico com os diferentes valores de sobrevivência para os grupos que foram injetados com as diferentes concentrações de *tra-2* dsRNA como porcentagem em

relação a sobrevivência do grupo controle, para os diferentes volumes de material injetado (Figura 5).

Figura 5 - Sobrevivência como % em relação ao controle dos diferentes grupos utilizados nos testes sobrevivência nos diferentes volumes testados, (valores no eixo x) considerando as diferentes concentrações injetados. Foram construídas linhas de tendência para cada concentração de material injetado, e o valor do lado da cada reta representa a inclinação desta reta.

No presente trabalho optou-se por injetar o dsRNA em concentração e volumes que garantissem uma alta taxa de sobrevivência dos parentais (desejável > 70%), mas que também apresentasse a maior quantidade de material injetado possível (em μg, acessado pela multiplicação entre volume injetado e a concentração, tabela II), assim relação de volume-concentração escolhida para o experimento foi a de 0,7 μL de solução de *transformer-2* dsRNA a 1,2 μg/μL.

Tabela II - Quantidade (em massa, μg) de *transformer-2* dsRNA injetado em cada um dos testes.

Volume	Concentração da solução de <i>tra-2</i> dsRNA		
	$1,8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$	$1,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$	$0,6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$
$1,0 \mu\text{L}$	1,8	1,2	0,6
$0,7 \mu\text{L}$	1,26	0,84	0,42
$0,5 \mu\text{L}$	0,9	0,6	0,3

IV.1.2 Injeção de *transformer-2* dsRNA na fêmea parental

As fêmeas parentais foram injetadas com *transformer-2* dsRNA, ou com tampão de injeção, de acordo com metodologia apresentada (III.1.2). Então, a mortalidade das fêmeas parentais foi contabilizada, tanto em um momento 24 horas após o procedimento de injeção quanto ao longo das cinco semanas em que se deu o experimento (Figura 6).

Depois de 24 horas do procedimento de injeção abdominal, 14 das 50 fêmeas tratadas morrem (72% de sobrevivência), no grupo EXP. Para o grupo CT 13 das 50 fêmeas tratadas morreram (74% de sobrevivência). Esses valores de sobrevivência são próximos aos encontrados nos testes do item IV.1.1, em mesma concentração e volume, corroborando a eficácia desses testes. O grupo CG não foi tratado.

Pode-se notar que a mortalidade acumulada ao longo das cinco semanas (Figura 6) não difere entre o grupo EXP e o grupo CT, mas ambas são maiores do que a mortalidade verificada para o grupo CG. Isso indica que a concentração e a quantidade de solução de dsRNA utilizados (EXP) não causa aumento da mortalidade além do que é inerente ao próprio procedimento de injeção intra-abdominal em si (CT).

Figura 6 - Mortalidade acumulada (%) das fêmeas da geração parental ao longo dos 35 dias (5 semanas) após o procedimento de injeção, excluindo-se a mortalidade inicial. *o grupo CG não foi submetido ao procedimento de injeção abdominal.

IV.1.3 Análise do cariótipo da progênie

Dos 20 machos da progênie de EXP que foram analisados quanto ao cariótipo 19 apresentaram divisões visíveis. Destes, 15 (78,9%) apresentaram cariótipo XY e, portanto, eram machos genotípicos (Figura 7b). Entretanto, os outros 4 (21,1%) apresentaram cariótipo XX (Figura 7a), se tratando, portanto, de indivíduos pseudomachos (Figura 7a). 19 e 17 machos dos grupos CT e CG,

respetivamente, apresentaram divisões visíveis (respectivamente), sendo que todos eram machos genotípicos.

Figura 7 - Cromossomos mitóticos de *A. sp.1 aff. fraterculus* ($2n=12$). (a) pseudomacho, com 12 cromossomos grandes, correspondentes aos autossomos e ao par sexual XX – padrão encontrado em 4 (21,1%) indivíduos analisados e (b) macho normal, com cromossomo Y pequeno e heterocromático, apontado na seta, padrão encontrado em 15 (78,9%) nos indivíduos analisados. Barra em B igual a 10 μ m, válida para A.

IV.1.4 Análise da proporção sexual da progênie

A análise da proporção sexual mostrou que o total da progênie (Figura 8 e Tabela III) do grupo EXP apresentou um desvio significativo da proporção sexual 1:1 a favor de machos ($\chi^2=10,084$; $p=0,001^*$), enquanto que nos grupos CT ($\chi^2=0,004$ com $p=0,949$) e CG ($\chi^2=0,010$ com $p=0,920$) a proporção encontrada apresentou-se dentro do esperado. Também foi feita uma análise considerando as amostras semanais que compõe a progênie de cada tratamento separadamente (Figura 9 e Tabela III). Pode-se verificar que, para todos os tratamentos, antes da submissão experimental os parentais geravam progênie com proporção sexual igual a 1:1 (controle interno CI). Na progênie do grupo EXP há um aumento na proporção de machos durante as três primeiras semanas, sendo significativo durante a segunda e a terceira semana ($\chi^2=4,792$; $p=0,028$ e

$\chi^2=4,694$; $p=0,030$, respectivamente), até atingir um ápice durante a terceira semana (69,44%). Após esse período a proporção de machos cai e a razão sexual encontrada não difere do esperado (1:1). Nos grupos CT e CG a proporção sexual de machos e fêmeas oscila ao redor de 50%, mas essas variações não são significativas.

Tabela III - Frequências (total e %) de machos e fêmeas observada, frequência esperada (em proporção sexual 1:1) e valor do teste χ^2 (valor mínimo do teste para rejeitar a hipótese-nula = 3,85; valores significativos em negrito), das progênes dos diferentes tratamentos, considerando tanto a composição por semana quanto o total* da progênie.

* O total da progênie não considera os valores do CI.

EXP						
Semana	♂		♀		esperado	χ^2
CI	15	50,00%	15	50,00%	15	0,033
S1	87	57,24%	65	42,76%	76	2,901
S2	62	61,39%	39	38,61%	50,5	4,792
S3	25	69,44%	11	30,56%	18	4,694
S4	6	46,15%	7	53,85%	6,5	0,000
S5	4	44,44%	5	55,56%	4,5	0,000
Total*	184	59,16%	127	40,84%	155,5	10,084
CT						
Semana	♂		♀		esperado	χ^2
CI	25	48,08%	27	51,92%	26	0,019
S1	36	47,37%	40	52,63%	38	0,118
S2	55	51,40%	52	48,60%	53,5	0,037
S3	23	52,27%	21	47,73%	22	0,023
S4	17	48,57%	18	51,43%	17,5	0,000
S5	7	58,33%	5	41,67%	6	0,083
Total*	138	50,36%	136	49,64%	137	0,004
CG						
Semana	♂		♀		esperado	χ^2
CI	17	47,22%	19	52,78%	18	0,028
S1	82	51,25%	78	48,75%	80	0,056
S2	62	51,67%	58	48,33%	60	0,075
S3	34	48,57%	36	51,43%	35	0,014
S4	18	47,37%	20	52,63%	19	0,026
S5	8	47,06%	9	52,94%	8,5	0,000
Total*	204	50,37%	201	49,63%	202,5	0,010

Figura 8 - Proporção sexual da progênie dos grupos EXP (n=311), CT (n=274) e CG (n=405), respectivamente. As barras azuis representam as frequências de machos e as vermelhas de fêmeas.

Figura 9 - Proporção sexual das progênies dos diferentes tratamentos, antes do tratamento (CI) e ao longo de 5 semanas após o tratamento. Os quadrados representam a proporção de machos e círculos representam as proporções de fêmeas. Valores significativos ($p < 0,05$) indicados com asterisco.

IV.2 Caracterização da progênie

IV.2.1 Obtenção da progênie afetada

Uma vez confirmada a capacidade de a aplicação de *tra-2* dsRNA na fêmea parental gerar o silenciamento gênico em sua progênie seguiu-se com a caracterização da progênie afetada, como forma de se investigar eventuais alterações fenotípicas relacionadas a aplicação *tra-2* pRNAi, tanto relacionadas a determinação sexual ou efeitos pleiotrópicos. Para isso três amostras experimentais adicionais (A, B e C), além de um tratamento controle (CONT), foram realizadas. Antes de caracterizá-las foi necessário demonstrar que essas amostras também apresentavam indivíduos com a expressão de *tra-2* silenciada. Para isso procurou-se analisar suas progênes quanto à proporção sexual e cariótipo.

A análise da proporção sexual, tanto considerando as amostras coletadas a cada semana após a injeção do *tra-2* dsRNA (Figura 10 e Tabela IV) quanto considerando o total dessa progênie (Figura 11 e Tabela IV) indicam que a progênie de todos os grupos tratados com *tra-2* dsRNA (A, B e C) apresentaram desvios significativos da proporção sexual a favor de machos, o que não foi verificado no grupo controle. O mesmo padrão temporal relatado no item IV.1.4 também foi verificado nessas realizações.

Além disso, o controle interno de todas as réplicas se mostrou com proporção sexual de 1:1, indicando que antes do tratamento as progênes exibiam proporção sexual normal e, portanto, os desvios observados se relacionam com o efeito de silenciamento gênico de *transformer-2*.

Tabela IV - Frequências (total e %) de machos e fêmeas observada, frequência esperada (em proporção sexual 1:1) e valor do teste χ^2 (valor mínimo do teste para rejeitar a hipótese-nula = 3,85; valores significativos em negrito), das progênes dos diferentes tratamentos, considerando tanto a composição por semana quanto o total* da progênie.

* O total da progênie não considera os valores do CI.

A						
Semana	♂		♀		esperado	χ^2
CI	89	52,66%	80	47,34%	84,5	0,379
S1	68	66,02%	35	33,98%	51,5	9,942
S2	8	66,67%	4	33,33%	6	0,750
S3	44	61,97%	27	38,03%	35,5	3,606
S4	11	61,11%	7	38,89%	9	0,500
S5	5	55,56%	4	44,44%	4,5	0,000
Total*	136	63,85%	77	36,15%	106,5	15,793
B						
Semana	♂		♀		esperado	χ^2
CI	22	46,81%	25	53,19%	23,5	0,085
S1	55	55,56%	44	44,44%	49,5	1,010
S2	49	61,25%	31	38,75%	40	3,613
S3	50	62,50%	30	37,50%	40	4,513
S4	4	57,14%	3	42,86%	3,5	0,000
S6	4	44,44%	5	55,56%	4,5	0,000
Total*	162	58,91%	113	41,09%	137,5	8,378
C						
Semana	♂		♀		esperado	χ^2
CI	18	45,00%	22	55,00%	20	0,225
S1	43	59,72%	29	40,28%	36	2,347
S2	90	61,64%	56	38,36%	73	7,459
S3	42	63,64%	24	36,36%	33	4,379
S4	9	56,25%	7	43,75%	8	0,063
S5	6	54,55%	5	45,45%	5,5	0,000
Total*	190	61,09%	121	38,91%	155,5	14,868
CONT						
Semana	♂		♀		esperado	χ^2
CI	80	47,34%	89	52,66%	84,5	0,3786982
S1	58	50,00%	58	50,00%	58	0,0086207
S2	38	52,78%	34	47,22%	36	0,125
S3	24	47,06%	27	52,94%	25,5	0,0784314
S4	19	51,35%	18	48,65%	18,5	0
S5	14	48,28%	15	51,72%	14,5	0
Total*	153	50,16%	152	49,84%	152,5	0

Figura 10 - Frequências de machos e fêmeas ao longo de 35 dias após a injeção de *tra-2* dsRNA em cada amostra. Os círculos correspondem às fêmeas e os quadrados aos machos. O primeiro ponto (CI) se refere ao controle interno de cada amostra (antes da aplicação de *tra-2* dsRNA). * desvios semanais significativos segundo teste χ^2 ($p < 0,05$).

Figura 11 - Frequências totais (%) de machos e fêmeas na progênie dos tratamentos A ($n=213$), B ($n=275$), C ($n=311$), CONT ($n=305$), Média ABC (n médio=266,33). As barras azuis se referem aos machos e as vermelhas às fêmeas.

Para concluir a etapa de confirmação do silenciamento gênico de *transformer-2* foi feita a análise do cariótipo, a fim de detectar a presença de pseudomachos (XX). Estes foram identificados na progênie dos grupos que foram tratados com *tra-2* dsRNA em frequências variáveis (Tabela V), e como esperado não foram encontrados na progênie do grupo controle. Estes resultados indicam que ocorreu o efeito esperado do silenciamento gênico de *transformer-2*, uma vez que, como a proteína Tra-2 é fundamental para o desenvolvimento do fenótipo feminino, a aplicação de pRNAi causou o silenciamento desse gene em alguns embriões com o cariótipo XX e estes se desenvolveram com o fenótipo masculino.

Tabela V – Número de metáfases analisáveis e frequências absolutas e relativas de machos (XY) e pseudomachos (XX) entre os machos da progênie das diferentes amostras.

Amostra	Divisões analisáveis	XY	% XY	XX	% XX
CONT	34	34	100	0	0
A	37	32	86,5	5	13,5
B	31	28	90,3	3	9,7
C	30	27	90	3	10
A+B+C	98	87	88,7	11	11,3

IV.2.2 Produção de pupas e emergência de adultos

Foram registrados o número de pupas e o número de adultos emergidos da progênie de cada amostra (A, B, C e CONT), e com base nisso foi calculada a frequência de emergência para cada uma delas (Tabela VI). Para determinar se as frequências de emergência encontradas em cada amostra tratada com *tra-2* dsRNA eram significativamente diferentes daquela encontrada no grupo controle esses valores foram comparados através de um teste χ^2 (Tabela VI). Entretanto este teste

indicou que não existem diferenças significativas nesses valores, indicando que as pupas da progênie de grupos tratados com *tra-2* dsRNA têm taxas de emergência similares aos não tratados.

Tabela VI – Número de pupas, número de adultos, emergência (%) e valores p do teste χ^2 com a correção de continuidade de Yates entre a proporção de emergência das diferentes amostras e o controle de injeção. Significativo quando $p < 0,05$. N/A = Não se aplica.

Amostra	Pupas	Emergência	Emergência (%)	p valor
A	302	213	70,53%	0,441
B	362	275	75,97%	0,367
C	423	311	73,52%	0,900
CONT	417	305	73,14%	N/A

IV.2.3 Testes de fertilidade dos machos

Durante esses testes cinco fatores foram analisados no total: (a) ocorrência de cópulas, (b) sobrevivência dos machos durante o período de observação, (c) fertilidade/esterilidade dos machos, (d) presença de espermatozoides móveis nos testículos dos machos e (e) nas espermatecas das fêmeas, como indicativo da capacidade de transferência de esperma para as fêmeas.

Destes, dois fatores, a ocorrência de cópulas (a) e a presença de espermatozoides móveis nos testículos (d), não variaram, sendo que foram verificadas em todos os casos testados (100%), tanto nos grupos experimentais quanto no grupo controle. Ou seja, todos os machos analisados apresentaram comportamento sexual tipicamente masculino, tanto de corte quanto de cópula, e também produziam espermatozoides móveis, que eram aparentemente normais. Nesses casos, em que a frequência de um determinado fator é igual a 0% ou 100% o teste de Fisher não é aplicável. Entretanto, como os outros fatores variaram,

essas proporções foram comparadas entre os grupos experimentais (A, B e C) e a proporção correspondente verificada no grupo CONT (Tabela VII).

Tabela VII –Valores totais e % para cada um dos fatores analisados durante os testes de fertilidade, e respectivos valores de p para o teste exato de Fisher (*significativo quando $p < 0,05$) comparando cada proporção com o controle. N/A= não se aplica

Amostra		A			B			C			CONT	
Fator analisado		Total	%	p	Total	%	p	Total	%	p	Total	%
(a) Presença de cópula	Sim	40	100	N/A	40	100	N/A	40	100	N/A	40	100
	Não	0	0		0	0		0	0		0	0
(b) Sobrevivência	Sim	35	87,5	0,5	35	87,5	0,5	34	85	0,622	34	85
	Não	5	12,5		5	12,5		6	15		6	15
(c) Fertilidade/ Esterilidade	Fértil	25	71,4	0,01*	23	65,7	<0,01*	24	70,6	0,01*	32	94,1
	Estéril	10	28,6		12	34,3		10	29,4		2	5,9
(d) Espermatozoides móveis	Sim	35	100	N/A	35	100	N/A	34	100	N/A	34	100
	Não	0	0		0	0		0	0		0	0
(e) Transferência de espermatozoides	Sim	28	80	0,03*	26	74,3	0,01*	26	76,5	0,01*	33	97,1
	Não	7	20		9	25,7		8	23,5		1	2,9

Os resultados desses testes indicam que (a) não há diferença significativa entre a mortalidade dos machos das progênes dos grupos tratados com *tra-2* pRNAi e a progênie do grupo controle; (b) há um aumento significativo da proporção de machos estéreis na progênie dos grupos experimentais; (c) este aumento de esterilidade está associado a um aumento na proporção de machos que são incapazes de transferir esperma para as fêmeas, apesar de apresentarem comportamento de corte e cópula típico masculino.

IV.2.4 Morfologia de estruturas sexuais

Quanto à morfologia sexual externa todos os machos analisados eram aparentemente normais, tanto nos grupos experimentais quanto nos grupos controle. Entretanto, após a dissecação, a análise do aspecto geral dos testículos

revelou que 4,8% do total de machos experimentais analisados apresentavam os testículos assimétricos. Um deles era aparentemente normal, em tamanho e de forma elíptica, e o outro era maior e esférico (Figura 12a). Essas alterações não foram detectadas no grupo controle.

As fêmeas analisadas do grupo controle eram todas normais, tanto em relação à morfologia externa quanto interna. Nos grupos experimentais todas as fêmeas eram aparentemente normais quanto às estruturas internas (gônadas e espermatecas). Entretanto, quanto à morfologia externa, uma fêmea do grupo experimental (0,83% do total) apresentava estrutura da bainha do ovopositor alterada (Figura 12b). Neste caso, a bainha do ovopositor era mais curta que o normal, aparentando estar pouco desenvolvida. Também não possuía abertura para a saída do acúleo, o que implica em um ovopositor não funcional. A estrutura malformada foi dissecada para análise e internamente havia acúleo, gônadas e espermatecas bem desenvolvidos. As frequências das alterações morfológicas encontradas são mostradas na tabela VIII.

Tabela VIII – Frequências das alterações morfológicas, masculinas e femininas, internas e externas, encontradas nos grupos experimentais. Não foi detectada nenhuma alteração morfológica nos indivíduos do grupo controle.

Sexo	Morfologia	A	B	C	Total
♂	Externa	0/35	0/35	0/34	0/104
	Interna	2/35 (5,7%)	2/35 (5,7%)	1/34 (2,9%)	5/104 (4,8%)
♀	Externa	0/40	1/40 (2,5%)	0/40	1/120 (0,83%)
	Interna	0/40	0/40	0/40	0/120

Figura 12 – Alterações morfológicas nas estruturas sexuais analisadas. (A) alteração observada de assimetria das gônadas de alguns machos; (B) alteração observada na morfologia sexual externa de uma pequena parcela das fêmeas; em todas as imagens as barras são iguais a 50 μ m

IV.2.5 Assimetria de asas e de cerdas

Para as análises de assimetria não foram considerados os indivíduos da amostra C, pois uma quantidade muito grande deles apresentou a estrutura das asas ou da cabeça danificadas. Portanto foram considerados, cerca de 40 indivíduos da semana S1 e 40 da semana S3 das amostras A, B e CONT, excluindo-se indivíduos que morreram, ou que apresentavam as estruturas danificadas.

IV.2.5.1 Asas

Os valores dos escores de assimetria de asas foram acessados por meio morfometria geométrica, expressos em distâncias de Procrustes. O teste de Levene ($F_{(5,136)} = 1,9919$; $p=0,0837$) indicou que as amostras eram homogêneas, então os escores de assimetria das asas das diferentes amostras foram comparadas através do teste ANOVA. O teste revelou que não havia diferenças significativas entre as amostras ($F_{(5, 136)} = 0,88450$, $p=0,49341$, g.l.=5).

IV.2.5.2 Cerdas frontais da cabeça

Primeiro foram feitas as análises preliminares para determinar se o tipo de assimetria da estrutura é compatível com o modelo de AF (Tabela IX). O resultado do teste-t pareado mostra que não existem diferenças significativas entre o número de cerdas dos dois lados da cabeça, e os valores da média dos escores de assimetria são próximos à zero, e os valores de assimetria (*skewness*) e curtose estão dentro da faixa de variação em que podem ser aproximadas a uma normal. Isso confirma que o tipo de assimetria verificado no conjunto de cerdas frontais da cabeça é compatível com o modelo de assimetria flutuante em todos os grupos analisados.

Então se seguiu com a análise para verificar se ocorreu aumento da assimetria nos grupos experimentais em relação aos seus respectivos controles. O teste de Levene revelou que as amostras eram homogêneas ($F_{(5,219)} = 1,1863$; $p=0,3168$). Portanto, os escores de assimetria das cerdas frontais, em módulo,

foram comparados através de um teste ANOVA. Foi encontrado que a AF diferia entre as amostras ($F_{(5, 219)} = 2,9537$, $p = 0,0133^*$; g.l.=5). Posteriormente foi feito o teste de Dunnet, utilizado para avaliar se existem diferenças entre as diferentes amostras dos grupos experimentais (S1 A, S3 A, S1 B, S3 B) e seus respectivos grupos controles (S1 CONT para S1 A e S1 B; e S3 CONT para S3 A e S3 B), considerando a hipótese de aumento da assimetria em relação ao controle. Esse teste revelou que uma amostra de cada grupo experimental difere dos seus respectivos controles, enquanto que a outra não (Tabela X). É interessante notar que essas amostras em que a diferença é significativa correspondem às semanas em que o desvio na proporção sexual foi significativo para ambas as amostras (Tabela IV e Figura 10).

Tabela IX – Resultados dos testes que indicam se a assimetria da estrutura analisada é do tipo flutuante (AF). Na AF não há diferença significativa entre a quantidade de cerdas de dos dois lados da cabeça (significativo a $p < 0,05$), e a média dos escores de assimetria é próxima a zero, e a assimetria e curtose não são significativas (entre -3 e +3).

Grupo	teste-t						
	N	Dif.	g.l.	p	Média	Skewness	Curtose
S1 CONT	40	0,075	39	0,5284	-0,075	0,12951	0,865401
S3 CONT	39	-0,025	38	0,7855	0,025	0,00018	0,171144
S1 A	37	-0,027	36	0,8753	-0,027	-0,10009	-0,511278
S3 A	34	0,117	33	0,4573	-0,118	-1,02380	1,841579
S1 B	38	0,078	37	0,5842	0,079	0,34001	0,598512
S3 B	37	-0,029	36	0,8755	0,000	0,15043	-0,608824

Tabela X – Resultado do teste de Dunnet (valores de p) comparando a AF de cerdas frontais da cabeças entre os grupos utilizados na análise e seus respectivos controles. Significativo a $p < 0,05$ (*).

Amostra	S1	S3
A	0,0025*	0,3900
B	0,1293	0,0306*

V – Discussão

Inicialmente, foram feitos testes de sobrevivência ao procedimento de injeção intra-abdominal com *tra-2* dsRNA, uma vez que não há registros da utilização da técnica de pRNAi para nenhuma espécie de *Anastrepha* até o momento. Esses testes revelaram que (1) há mortalidade que se deve ao próprio procedimento de injeção realizado, verificada através dos diferentes valores de sobrevivência dos grupos controle (injetados com tampão de injeção); e que (2) quanto maior o volume de material injetado maior é a mortalidade. Isso se torna evidente no decréscimo da sobrevivência na medida em que há aumento do volume de material injetado, tanto considerando as diferentes concentrações de *transformer-2* dsRNA utilizadas quanto o tampão. Os resultados ainda sugerem que (3) quanto maior a concentração de *transformer-2* dsRNA injetado maior é a mortalidade ao procedimento de injeção, o que pode se relacionar com possível efeito de dose letal dessa solução para os organismos. Observando a figura 5 pode-se notar que existe um efeito da concentração na sobrevivência aos testes de injeção, indicados pela inclinação das retas; quanto maior a concentração de *transformer-2* dsRNA injetado maior é a inclinação da reta, em módulo, o que indica que quanto maior for a concentração maior será a mortalidade.

A análise da mortalidade dos parentais injetados com *tra-2* dsRNA, para posterior análise da progênie, medida 24 horas após a injeção mostra que os valores verificados para os grupos experimentais são próximos aos encontrados para o grupo injetado com tampão. Além disso, visivelmente, a curva de mortalidade dos parentais ao longo do tempo (Figura 6) dos grupos experimentais e controle injetado com tampão, apresentam o mesmo comportamento. Entretanto, esses dois casos (injetado com dsRNA e tampão) semelhantes entre si, diferem do caso em que as moscas não foram tratadas (controle geral), indicando que a maior mortalidade verificada nos parentais do grupo

experimental se deve ao procedimento de injeção intra-abdominal em si, e não a presença do dsRNA. A maior mortalidade verificada nos grupos que foram submetidos ao procedimento de injeção intra-abdominal pode se dever a própria injúria causada pela agulha, com perda de hemolinfa e/ou infecções causadas por bactérias que entram pelo local onde a agulha foi inserida.

Tendo isso em vista, pode-se observar que, apesar de um provável efeito de dose letal verificado em concentrações maiores, para a faixa de concentração de dsRNA testada, a sobrevivência ao procedimento de injeção é maior se comparada ao método de injeção diretamente nos embriões; sendo que aqui foi registrado cerca de 70% de sobrevivência e no caso de injeção no embrião obtém-se cerca de 5% (SARNO *et al.*, 2010). Isso é desejável, visto que possibilita uma perda menor de indivíduos tratados com o dsRNA, otimizando assim a técnica de interferência por dsRNA para o estudo da função de genes que atuam no começo do desenvolvimento embrionário. É importante ressaltar que a quantidade de material injetado foi definida pelo critério de menor efeito de mortalidade possível dos indivíduos parentais, e não com base na magnitude do efeito do silenciamento gênico na progênie, já que existe o indicativo de efeito de dose letal relacionado à concentração de dsRNA. Seria possível que concentrações maiores de material injetado causassem alterações mais profundas no fenótipo da progênie do que o que foi encontrado, mas análises adicionais teriam de ser feitas para estabelecer esse limite.

Importante ressaltar que o presente trabalho, com estes testes, estabelece os parâmetros iniciais a serem considerados na utilização da técnica de pRNAi em espécies de *Anastrepha*. Entretanto, outros parâmetros ainda precisam ser testados para que se tenha um aproveitamento ótimo no uso desta técnica, como testes não só de sobrevivência, mas também da magnitude dos efeitos na progênie verificados quando da aplicação de diferentes concentrações de dsRNA em uma faixa mais ampla de variação.

Posteriormente, foi analisado se o silenciamento gênico de fato ocorreu na progênie das fêmeas tratadas. A alteração fenotípica mais marcante do silenciamento gênico de *transformer-2* é a alteração do desenvolvimento de embriões que são geneticamente fêmeas (XX), que acabam por se desenvolver com o fenótipo masculino, os pseudomachos (SARNO *et al.*, 2010). Como resultado desse fenômeno, observa-se que um grupo de indivíduos tratados com *transformer-2* dsRNA apresenta a proporção sexual enviesada a favor de machos (SARNO *et al.*, 2010). No presente trabalho procurou-se verificar se o silenciamento gênico por RNAi pode ser feito a partir da aplicação do dsRNA no parental com o efeito do silenciamento sendo verificado em sua progênie. Para isso foi escolhido o gene *transformer-2*, cujo silenciamento apresenta essa alteração fenotípica conhecida e facilmente verificável, através de análise do cariótipo.

Constatou-se que, frequências variadas dos machos fenotípicos analisados correspondiam aos pseudomachos, pois tinham cariótipo completo sem o cromossomo Y. Eles são fêmeas genotípicas que, graças ao silenciamento da expressão de *transformer-2* em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário se desenvolveram com o fenótipo masculino. Com isso foi possível demonstrar que ocorreu a transferência de moléculas de *transformer-2* dsRNA da cavidade abdominal de fêmeas para parte dos ovócitos que comporão sua progênie.

A presença dos pseudomachos se reflete em uma maior proporção de machos do que de fêmeas nos grupos que foram submetidos ao tratamento com *transformer-2* dsRNA (figuras 8 e 11), apresentando desvio significativo da proporção sexual esperada de 1:1. Esse resultado, embora esperado, demonstra que a alteração obtida é parcial, uma vez que apenas uma parcela dos indivíduos XX se desenvolveu como pseudomachos, enquanto que a maioria apresentou o fenótipo feminino normal. Outro ponto que pode ser argumentado é se esse desvio na proporção sexual é completamente explicado pela presença de pseudomachos ou se haveria algum outro efeito que resultaria nesse quadro, como, por exemplo,

a mortalidade preferencial de fêmeas em alguma etapa do desenvolvimento ontogenético. Para elucidar se a transformação de fêmeas genotípicas em pseudomachos (XX) é capaz de explicar todo o desvio sexual observado pode-se analisar a frequência com que os pseudomachos foram encontrados.

Considerando-se o total de indivíduos analisados nas duas etapas do trabalho (isto é, amostra EXP + amostras A, B e C), dos 117 machos analisados quanto ao cariótipo (19 de EXP + 98 de A, B e C), cerca de 12,8% (15/117) eram pseudomachos. A proporção sexual de machos na progênie encontrada foi próxima a 60% em todos os casos. Uma frequência de 60% de machos, para ser explicada completamente pela presença dos pseudomachos, implicaria que 16,5% do total de machos fossem os pseudomachos. Esse valor é próximo ao verificado e, se submetermos o valor encontrado de pseudomachos ao teste estatístico do χ^2 (com correção de continuidade de Yates, considerando como hipótese-nula a frequência de 16,5% de pseudomachos dentre o total de machos, significativo a $p < 0,05$), a hipótese-nula não é rejeitada ($\chi^2 = 0,9769$; $p = 0,3229$), sugerindo que a presença dos pseudomachos nas amostras explica a maior proporção de machos verificada na progênie.

Essa maior proporção de machos verificada na progênie apresenta um padrão temporal característico ao longo das cinco semanas amostradas (figuras 9 e 10). Pode-se verificar que há um aumento na proporção de machos durante as três primeiras semanas até atingir um ápice, sendo que o período em que esse aumento é significativo varia entre as amostras (tabelas III e IV). Após esse período a proporção de machos cai e a razão sexual encontrada não difere do esperado 1:1. Esse comportamento encontrado do efeito do silenciamento gênico é semelhante ao inicialmente descrito para *Caenorhabditis elegans* (FIRE *et al.*, 1998), no primeiro trabalho que relata efeitos da transferência de dsRNA da cavidade corporal de indivíduos parentais para os ovócitos que constituem a progênie. Em uma das realizações, os autores relatam que a injeção de dsRNA na cavidade corporal produz uma interferência específica e robusta na expressão

gênica da progênie, e descrevem ainda que essa interferência apresenta um padrão temporal característico. Em um primeiro momento, após a injeção de dsRNA, quase nenhum indivíduo apresenta o fenótipo alterado. Os autores propõem que isso pode estar relacionado com o fato de que a progênie, nesse primeiro momento, corresponda a ovos já fertilizados, impermeáveis ao dsRNA, o que impediria o silenciamento gênico e seus efeitos. Em um segundo momento, uma grande parcela da progênie apresenta os efeitos esperados do silenciamento gênico e em um terceiro momento uma parcela pequena apresenta os efeitos esperados ou efeitos intermediários do silenciamento gênico, correspondentes a indivíduos que incorporaram poucas moléculas de dsRNA, que foi se esgotando e se degradando ao longo do tempo.

Este padrão temporal de efeito de pRNAi descrito para *C. elegans* é semelhante ao verificado no presente trabalho, e a explicação apresentada também é aplicável ao caso uma vez que, neste trabalho, o desenho experimental também envolvia aplicação de dsRNA na cavidade corporal de indivíduos parentais que já estavam colocando ovos fertilizados (CI) e, portanto, impermeáveis à entrada das moléculas de dsRNA devido a formação do córion.

Outro ponto importante que pode ser levantado a partir dessa maior proporção de machos na progênie, a partir do silenciamento de *transformer-2* em *Anastrepha*, é sua potencial utilidade para estratégias de controle populacional desses insetos nas quais seja necessária a produção de elevada quantidade de machos produzidos em biofábricas. A produção de um maior número de machos é necessária, por exemplo, para a técnica do inseto estéril (TIE) ou técnica do inseto incompatível (TII). A primeira consiste na submissão de machos produzidos em biofábricas, à radiação como forma de esterilizá-los. Na segunda, os machos são infectados com um endossimbionte que gera incompatibilidade reprodutiva entre os machos produzidos e as fêmeas selvagens. Em ambos os casos estes machos são liberados no campo onde copulam com fêmeas selvagens. Elas, por sua vez, podem até vir a colocar seus ovos, porém as larvas não

eclodirão, conseguindo-se assim, reduzir o tamanho populacional desses insetos nas zonas de fruticultura a cada safra. É clara a importância da produção da maior quantidade possível de machos na biofábricas para a eficácia destas técnicas.

A injeção de dsRNA de genes envolvidos no processo de determinação sexual, diretamente nos parentais, ainda não é viável para aplicação em produção de larga escala, por questões metodológicas. Entretanto, a demonstração de que ocorre a transferência das moléculas de dsRNA do parental para a progênie em *Anastrepha* abre a possibilidade para que outros métodos de oferta de dsRNA para o parental, mais adequados para o modelo de produção em larga escala, possam vir ser testados com a finalidade de se promover o silenciamento desses genes na progênie, por exemplo a oferta via dieta alimentar (LI *et al.*, 2011; UPAHYAY *et al.*, 2011; KHAJUIRA *et al.*, 2015; WHYARD *et al.*, 2015).

Para que se possa fazer uso de indivíduos produzidos com este método, é necessária sua caracterização detalhada, com o intuito de conhecer melhor a extensão dos efeitos que o silenciamento gênico - seja *transformer-2* ou de outros genes da determinação sexual - pois eles podem, teoricamente, inclusive diferir daqueles observados no silenciamento gênico feito por injeção diretamente nos embriões, uma vez que no pRNAi o silenciamento ocorre em uma etapa anterior do desenvolvimento (BUCHER *et al.*, 2002; KHILA & GRÍBC, 2007). Isso é especialmente relevante para genes cuja presença da proteína materna é atuante na sua regulação no embrião, como é o caso de *transformer-2* (SARNO *et al.*, 2010). Somente com uma caracterização detalhada, é possível averiguar se estes indivíduos seriam capazes de competir com os machos selvagens, copular com as fêmeas, e assim, concluir se estariam aptos a serem utilizados em estratégias de controle populacional desses insetos.

Na segunda etapa do trabalho pretendeu-se fazer uma prospecção dos indivíduos da progênie. O primeiro ponto avaliado foi a frequência de emergência da progênie. Foi verificado que a diferença na frequência de emergência entre os grupos tratados com *tra-2* dsRNA e o grupo não tratado não é estatisticamente

significativa (tabela VI). Isso serve como um indicativo de que o tratamento com *tra-2* dsRNA do parental não causa diminuição da taxa de emergência, o que é desejável visando a utilização desta técnica na produção de moscas.

Durante os testes de fertilidade dos machos da progênie o que se verificou é que não há diferença na mortalidade dos machos durante o período analisado e que todos os machos analisados, incluindo os pseudomachos, apresentaram comportamento típico de corte e de cópula, além de terem produzido espermatozoides móveis. Estes dados estão de acordo com o que fora previamente descrito para *Anastrepha suspensa* a partir da aplicação de *tra-2* dsRNA nos embriões (SCHETELIG *et al.*, 2012). Esses resultados revelam que os pseudomachos foram transformados não só em relação ao fenótipo da morfologia sexual, mas também em relação ao comportamento e a produção de espermatozoides. Além disso, esses resultados compõem mais um ponto que é desejável do ponto de vista aplicado, uma vez que a proposta consiste em que os indivíduos produzidos através deste tipo de abordagem acasalem com as fêmeas do campo para o sucesso da aplicação da TIE/TII.

Entretanto, encontrou-se uma maior proporção de indivíduos estéreis dentre os machos de todas as réplicas experimentais em relação ao controle (Tabela VII). Estes indivíduos estéreis possivelmente correspondem aos pseudomachos, assim como previamente descrito para *A. suspensa* (SCHETELIG *et al.*, 2012). Isso é diferente do que acontece em *Ceratitis capitata* (SALVEMINI *et al.*, 2009) e *Bactrocera dorsalis* (LIU *et al.*, 2015), onde os pseudomachos são férteis, dando origem a progênie F₂ composta só por fêmeas, o que não foi verificado nesta realização. O presente trabalho traz como novidade a associação entre essa maior proporção de machos estéreis e a incapacidade de esses indivíduos transferirem espermatozoides para as fêmeas, ainda que produzam espermatozoides móveis.

Como não é possível determinar se de fato desses indivíduos estéreis correspondem aos pseudomachos, apesar da associação entre esses fenômenos,

não é possível estabelecer, de forma clara, uma relação causal entre esterilidade devido a falha na transferência de esperma diretamente com as funções de gene *transformer-2*. Entretanto isto é provável, visto que o gene *tra-2* está a montante de uma cascata de determinação genética que envolve o comportamento sexual desses insetos, através da regulação da expressão de genes como *fruitless* e *period* (SANCHEZ, 2008). Cabe ressaltar que o comportamento reprodutivo desses insetos é complexo e envolve várias estimulações das fêmeas por parte dos machos e a seleção destes últimos pelas fêmeas através de mecanismos pré e pós-copulatórios (SUGAYAMA & MALAVASI, 2000). Assim, seria possível que machos com a expressão de *transformer-2* silenciada, não consigam estimular a fêmea de forma eficiente, e essas acabam por não receber ou até por rejeitar o esperma depositado por esses machos (MASTA & MADISON, 2002; ABRAHAM *et al.*, 2014). Outra hipótese é de que algum gene localizado no cromossomo Y de *Anastrepha*, ausente nos pseudomachos, esteja relacionado com a capacidade de transferir espermatozoides. Mais testes são necessários para esclarecer esse fenômeno.

A análise da morfologia sexual revelou que uma pequena fração dos machos da progênie, possivelmente os pseudomachos, apresenta alterações na morfologia de estruturas sexuais internas, especificamente de assimetria dos testículos. Essas alterações apresentam menor variedade se comparadas aos trabalhos anteriores feitos com *Anastrepha* (SARNO *et al.*, 2010; SCHETELIG *et al.*, 2012), onde foram relatados além de indivíduos com testículos assimétricos, indivíduos com os dois testículos atrofiados, ou hipertrofiados, ou até mesmo indivíduos com estruturas sexuais internas em mosaico dentre os pseudomachos. Essa diferença de classes de fenótipos alterados encontrados pode ser devida tanto a uma menor perturbação causada por este método – uma vez que a agulha não é colocada em contato direto com o embrião durante a injeção – mas também pelo fato de que o dsRNA agir em um estágio anterior do desenvolvimento embrionário (BUCHER *et al.*, 2002; KHILA & GRÍBC, 2007),

agindo ainda na fase de ovócito e inibindo a tradução da proteína Tra-2 materna, resultando em uma alteração mais completa do fenótipo sexual.

Estes resultados oriundos das análises do fenótipo da progênie revelam pontos que são relevantes de uma perspectiva prática, uma vez que mostram que há produção de uma maior quantidade de machos na progênie, capazes de copular com as fêmeas e que só uma fração pequena destes apresenta alterações de estruturas sexuais detectadas, sendo assim semelhantes às moscas selvagens. Entretanto os indivíduos da progênie podem não ter as mesmas capacidades competitivas que as moscas selvagens. Isso por que foi verificado que a progênie tratada apresenta valores significativamente maiores de assimetria no conjunto de cerdas frontais em relação ao controle, nas mesmas semanas em que o desvio da proporção sexual é maior (tabela X). Esse fato, além de refletir perturbações no desenvolvimento desses indivíduos (PIRES, 2005; SOUZA *et al.*, 2007), causadas pela aplicação do *tra-2* dsRNA também indica que eles podem não ser tão bem-sucedidos na competição pelas fêmeas (HUNT *et al.*, 2002.), o que pode diminuir sua competitividade com os indivíduos do campo.

Porém, como também não foram verificadas diferenças significativas em relação à assimetria das asas pode ser que essa perturbação ontogenética não seja tão profunda e dessa forma a possibilidade de sucesso reprodutivo não estaria tão comprometida. Além disso, o mais correto não seria comparar esses indivíduos com os do campo, e sim com os indivíduos que são atualmente utilizados em estratégias de controle populacional, criados em condição de larga escala. Porém não existem trabalhos que revelem os valores de assimetria de indivíduos que são criados em biofábricas.

Em suma, os resultados obtidos no presente projeto indicam que a técnica de RNAi parental em *Anastrepha* abre caminho para que novas estratégias de produção de machos em biofábricas sejam desenvolvidas, visando a sua otimização. Uma vez que a injeção do dsRNA no abdome de fêmeas parentais ainda está longe da realidade exequível em uma biofábrica, é possível que outras

estratégias para fornecimento de dsRNA para os parentais, com posterior incorporação aos ovócitos, sejam testadas, como por exemplo a oferta de dsRNA via alimentação (LI *et al.*, 2011; UPAHYAY *et al.*, 2011; KHAJUIRA *et al.*, 2015; WHYARD *et al.*, 2015).

Sabe-se que diferentes estratégias de fornecimento de dsRNA para silenciamento gênico tem diferentes vantagens e desvantagens e, possivelmente, alguma dessas estratégias poderia se mostrar mais eficiente tanto no que se refere tanto a facilidade de oferta e incorporação das moléculas de dsRNA quanto às taxas de mortalidade e à magnitude dos efeitos verificados na progênie (PRICE & GATEHOUSE, 2008; YU *et al.*, 2013). Existe a possibilidade de a aplicação de dsRNA de *tra-2* junto com dsRNA de *tra* levar a produção de uma progênie com uma frequência ainda maior de machos, como já testado em outras moscas-das-frutas através de injeção no embrião (SCHETELIG *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2015), sendo que nesses casos a frequência de machos chegou próxima a 100%. Esse recurso também poderia ser testado para aumentar a eficácia da utilização de pRNAi para a produção de frequência ainda maior de machos em biofábricas, em um contexto aplicado. De qualquer forma o presente trabalho mostra que, ainda que a técnica precise ser aprimorada para ser utilizada na produção em biofábricas, o pRNAi é uma promissora ferramenta que pode ser utilizada para esse fim.

Além dessa perspectiva de cunho aplicado, os resultados do presente trabalho mostram que a técnica do RNAi parental apresenta vantagens em relação a técnica da injeção em embriões utilizada anteriormente, por causar menor mortalidade e por sua facilidade metodológica. Além disso, é mais adequada para o estudo da função de genes em que a expressão no embrião é influenciada pela presença da proteína materna e de genes que atuam logo nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário.

VI - Conclusões

Através deste projeto pode-se concluir que

1. A aplicação de dsRNA no indivíduo parental apresenta considerável vantagem experimental em relação a injeção de dsRNA diretamente nos embriões, devido a menor mortalidade ao procedimento;
2. A aplicação de *transformer-2* dsRNA na fêmea parental gera progênie com as alterações fenotípicas esperadas pelo silenciamento da expressão desse gene, incluindo a presença de pseudomachos (XX);
3. O silenciamento gênico causado na progênie é transiente, sendo que ocorre entre as 3 primeiras semanas após o tratamento com dsRNA;
4. Essa abordagem permite promover o silenciamento de genes cuja presença da proteína materna tenha efeito na expressão do gene no embrião, ampliando assim o espectro de possibilidades de utilização desta técnica;
5. O gene *transformer-2* atua na determinação do fenótipo sexual em *Anastrepha*, sendo que a proteína Transformer-2 funcional é necessária para determinação do fenótipo feminino, tanto morfológico quanto comportamental;
6. Os dados obtidos corroboram a atual hipótese de determinação sexual em Tephritidae;
7. É possível que algum fator masculinizante (fator M) esteja relacionado à capacidade dos machos de transferir espermatozoides para as fêmeas, alternativamente o gene *transformer-2* pode atuar nesse sentido;
8. A aplicação de RNAi parental de *transformer-2* gera perturbação no desenvolvimento ontogenético;

9. A manipulação da expressão do gene *transformer-2*, e potencialmente outros genes relacionados ao processo de determinação sexual, pode contribuir para a otimização da produção de machos em biofábricas;
10. A produção de pseudomachos (XX) estéreis a partir da manipulação da expressão de *transformer-2*, e potencialmente outros genes relacionados ao processo de determinação sexual, abre um leque de possibilidades de aplicações desses indivíduos em mecanismos e estratégias de controle populacional de *Anastrepha sp.*.

VII - Referências Bibliográficas

- ABRAHAM, S.; RULL, J.; MENDOZA, M.; LIENDO, M. C.; DEVESCOVI, F.; RORIZ, A. K.; KOVALESKI, A.; SEGURA, D. F.; VERA, M. T. Differences in sperm storage and remating propensity between adult females of two morphotypes of the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex. *Bulletin of Entomological Research*, 104, p. 376-382, 2014.
- BAKER, A. C. A review of studies on the mexican fruit fly and related mexican species. United States Department of Agriculture. Miscellaneous Publication, 531, p. 1-155, 1944.
- BÖLLER, E. F. 1968. An artificial oviposition device for the European cherry fly, *Rhagoletis cerasi*. *Journal of Economic Entomology*. 61, p. 1227-1234, 1968.
- BRÍZÓVA, R.; MENDONÇA, Adriana L.; VANÍCKOVÁ, L.; MENDONÇA, Alana L.; SILVA, C. E.; TOMCALA, A.; AGUIAR, B.; PARANHOS, J.; DIAS, V. S.; JOACHIM-BRAVO, I. S.; HOSKOVEC, M.; KALINOVÁ, B.; NASCIMENTO, R. R. Pheromone Analyses of the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) Cryptic Species Complex. *Florida Entomologist*, 96(3), p. 1107-1115, 2013.
- BUCHER, G.; SCHOLTEN, J.; KLINGER, M. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Current Biology*, 12, p. 85-86, 2002.
- BULMER, M. G. *Principles of statistics*. Courier Corporation, 2012.
- BUSH, G. L. The cytotaxonomy of the larvae of some Mexican fruit flies in the genus *Anastrepha* (Tephritidae: Diptera). *Psyche*, 6, p. 87-101, 1962.
- CÁCERES, C.; SEGURA, D.F.; VERA, M.T.; WORNAYPORN, V.; CLADERA, J.L.; TEAL, P.; SAPOUNTZIS, P.; BOURTZIS, K.; ZACHAROPOULOU, A.; ROBINSON, A. R. Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) by studies on mating

- compatibility, sex pheromones, hybridization and cytology. *Biological Journal of Linnean Society*, 97, p. 152-165, 2009.
- CANAL, N. A.; HERNÁNDEZ-ORTIZ V.; SALASC J. O. T; SELIVON, D. Morphometric study of third-instar larvae from five morphotypes of the *Anastrepha fraterculus* cryptic species complex (Diptera, Tephritidae). *ZooKeys*, n. 540, p. 41, 2015.
- CHEN, S. L.; DAIC S. M.; LUC K. H.; CHANG C. 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(2), p. 155-165, 2008.
- DAFA'ALLA, T.; FU, G.; ALPHEY, L. Use of a regulatory mechanism of sex determination in pest insect control. *Journal of genetics*, 89(3), p. 301-305, 2010.
- DEVESCOVI, F.; ABRAHAM, S.; RORIZ, A. K. P; NOLAZCO, N.; CASTAÑEDA, R.; TADEO, E.; CÁCERES, C.; SEGURA, D. F.; VERA, T.; JACHIM-VRAVO, I. S.; CANAL, N.A.; RULL, J. Ongoing speciation within the *Anastrepha fraterculus* cryptic species complex: the case of the Andean morphotype. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 152, p. 238-247, 2014.
- DZITOYEVA, S.; DIMITRIJEVIC, N.; MANEV, H. Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system. *Molecular psychiatry*, 6(6), p. 665-670, 2001.
- FARIA, F. A.; PERRE, P.; ZUCCHI, R. A.; JORGE, L. R.; LEWINSOHN, T. M.; ROCHA, A.; TORRES, R. S. Automatic identification of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Visual Communication and Image Representation*, 25(7), p. 1516-1527, 2014.

- FIRE, A.; XU, S. Q.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), p. 806-811, 1998.
- GEMPE, T.; BEYE, M. Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. *Bioessays*, 33, p. 52–60, 2011.
- GU, L.; KNIPPLE, D. C. Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies. *Crop Protection*, 45, p. 36-40, 2013.
- HERNANDEZ-ORTIZ, V.; GÓMEZ-ANAYA, J. A.; SÁNCHEZ, A.; MCPHERON, B. A.; ALUJA, M. 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, p. 487-499, 2004.
- HERNANDEZ-ORTIZ, V.; BARTOLUCCI, A. F.; MORALES-VALLES, P.; FRÍAS, D.; SELIVON, D. 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, p. 305-318, 2012.
- HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; CANAL, N. A.; SALAS, J. O. T.; RUÍZ-HURTADO, F.; DZUL-CAUICH, J. F. Taxonomy and phenotypic relationships of the *Anastrepha fraterculus* complex in the Mesoamerican and Pacific Neotropical dominions (Diptera, Tephritidae). *ZooKeys*, n. 540, p. 95, 2015.
- HERTEL, K. J.; LYNCH, K. W.; HSIAO, E. C.; LIU, E. H.; MANIATIS, T. Structural and functional conservation of the *Drosophila doublesex* splicing enhancer repeat elements. *RNA*, 2, p. 969-981, 1996.
- HUNT, M. K.; NICHOLLS, C. J.; WOOD, R. J.; RENDON, A. P.; GILBURN, A. S. Sexual selection for symmetrical male medflies (Diptera: Tephritidae) confirmed in the field. *Biological journal of the Linnean Society*, 81(3), p. 347-355, 2004.

- KHAJUIRA, C.; VÉLES, A. M.; RANGASAMY, M.; WANG, H.; FISHILEVICH, E.; FREY, M. L. F.; CARNEIRO, N. P.; GANDRA, P.; NARVA, K. E; SIEGFRIED, B. D. Parental RNA Interference of Genes Involved in Embryonic Development of the Western Corn Rootworm, *Diabrotica virgifera* (LeConte). *Insect biochemistry and molecular biology*, 63, p. 54-62, 2015.
- KHILA, A.; GRBÍČ, M. Gene silencing in the spider mite *Tetranychus urticae*: dsRNA and siRNA parental silencing of the *Distal-less* gene. *Development Genes and Evolution*, 217, p. 241-251, 2007.
- KLINGENBERG, C. P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources* 11(2), p. 353-357, 2011.
- LI, X.; ZHANG, M.; ZHANG, H. RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PloS one*, v. 6, n. 3, p. e17788, 2011.
- LIU, G.; WU, Q.; LI, J.; ZHANG, G.; WAN, F. RNAi-Mediated Knock-Down of *transformer* and *transformer-2* to Generate Male-Only Progeny in the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *PloS one*, 10(6), p. e0128892, 2015.
- LIU, P. Z.; KAUFMAN, T. C. *even-skipped* is not a pair-rule gene but has segmental and gap-like functions in *Oncopeltus fasciatus*, an intermediate germband insect. *Development*, 132(9), p. 2081-2092, 2005.
- LOPES, G. N.; ARIAS, A. S.; CONSOLI, F. L.; ZUCCHI, R. A. The Identity of Specimens of the *Anastrepha fraterculus* Complex (Diptera, Tephritidae) with Atypical Aculeus Tip. *Neotropical Entomology*, 42(6), p. 618-627, 2013.
- LYNCH, J. A.; DESPLAN, C. A method for parental RNA interference in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Nature Protocols- Eletronic Edition*, 1(1), p. 486, 2006.

- MARQUES-SOUZA, H.; ARANDA, M.; TAUTZ, D. Delimiting the conserved features of *hunchback* function for the trunk organization of insects. *Development*, 135(5), p. 881-888, 2008.
- MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A.; SUGAYAMA, R. L. Biogeografia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Org.) *Moscas das frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Holos, Ribeirão Preto, p. 93-98, 2000.
- MASTA, S.E.; MADDISON, W.P. Sexual selection driving diversification in jumping spiders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, p. 4442-4447, 2002.
- MENDES, L. O. T. Observações citológicas em “moscas-das-frutas”. *Bragantia*, 17, p. 29-39, 1958.
- MORGANTE, J. S.; MALAVASI, A.; BUSH, G. L. Biochemical systematics and evolutionary relationships of neotropical *Anastrepha*. *Annals of Entomological Society of America*, 73, p. 622-30, 1980.
- OGAUGWU, C. E.; SCHETELIG, M. F.; WIMMER, E. A. Transgenic sexing system for *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) based on female-specific embryonic lethality. *Insect biochemistry and molecular biology*, 43(1), p. 1-8, 2013.
- OROÑO, L.; PAULIN, L.; ALBERTI, A. C.; OVRUSKI, S.; VILARDI, J. C; RULL, J.; ALUJA, M. Effect of host plant chemistry on genetic differentiation and reduction of gene flow among *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) populations exploiting sympatric, synchronic hosts. *Environmental entomology*, 42(4), p. 790-798, 2013.
- PALMER, A. R.; STROBECK, C. Fluctuating Asymmetry Analyses Revisited. *Developmental Instability: Causes and Consequences*, Oxford University Press, Oxford, p. 279-319, 2003.
- PERRE, P.; JORGE, L. R.; LEWINSOHN, T. M.; ZUCCHI, R. A. Morphometric Differentiation of Fruit Fly Pest Species of the *Anastrepha fraterculus* Group

- (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 107(2), p. 490-495, 2014.
- PIRES, A. O. *Variações no padrão simétrico de cerdas em diferentes condições de desenvolvimento em Anastrepha (Diptera: Tephritidae)*. Tese de Doutorado, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.
- PREZOTTO, L. *Análise do ITS1 do DNA ribossomal em espécies do complexo *Anastrepha fraterculus**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.
- PRICE, D.; GATEHOUSE, J. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in biotechnology*, v. 26, n. 7, p. 393-400, 2008.
- ROHLF F. J. *tpsDig, version 2. 10*. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, 2006.
- RUIZ M. F.; STEFANI, R. N.; MASCARENHAS, R. O.; PERONDINI, A. L. P., SELIVON, D.; SÁNCHEZ, L. The gene *doublesex* of the fruit fly *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). *Genetics* 171: 849–854, 2005.
- RUIZ, M. F.; MILANO, A.; SALVEMINI, M.; EIRÍN-LÓPES, J. M.; PERONDINI, A. L. P.; SELIVON, D.; POLITO, C.; SACCONI, G.; SÁNCHEZ, L. The gene transformer of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, tephritidae) and its evolution in insects. *PLoS One*, 2(11), e. 1239. 2007.
- RUIZ, M. F.; EIRÍN-LÓPES, J. M.; STEFANI, R. M.; PERONDINI, A. L. P.; SELIVON, D.; SÁNCHEZ, L. The gene *doublesex* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *Development genes and evolution*, 217(10), p. 725-731, 2007.
- RULL, J.; ABRAHAM, S.; KOVALESKI, A.; SEGURA, D. F.; ISLAM, A.; WORNOPORN, V.; DAMMALAGE, T.; SANTO-TOMAS, U.; VERA, M. T. Random mating and reproductive compatibility among Argentinean

- and southern Brazilian populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Bulletin of entomological research*, 102(04), p. 435-443, 2012.
- RULL, J.; ABRAHAM, S.; KOVALESKI, A.; SEGURA, D. F.; MENDOZA, M.; LIENDO, M. C.; VERA, M. T. Evolution of pre-zygotic and post-zygotic barriers to gene flow among three cryptic species within the *Anastrepha fraterculus* complex. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 148, p. 213–222, 2013.
- SACCONE, G.; PANE, A.; SIMONE, A.; SALVEMINI, M.; MILANO, A.; ANNINZIATA, L.; MAURO, U.; POLITO, L. C. New sexing strains for Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*: transforming females into males. *Area-wide control of insect pests*. Springer Netherlands, p. 95-102, 2007.
- SALVEMINI, M.; ROBERTSON, M.; ARONSO, B.; ATKINSON, P.; POLITO, L. C.; SACCONE, G. *Ceratitidis capitata* transformer-2 gene is required to establish and maintain the autoregulation of Cctra, the master gene for female sex determination. *International Journal of Developmental Biology*, v. 53, n. 1, p. 109, 2009.
- SANCHEZ, R. L. Sex determining mechanisms in insects. *International Journal of Developmental Biology*, 52(7), p. 837-856, 2008.
- SARNO, F.; RUIZ, M. F.; EIRÍN-LOPÉS, J. M.; PERONDINI, A. L. P.; SELIVON, D.; SÁNCHEZ, L. The gene *transformer-2* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *BMC evolutionary biology* 10, p. 140, 2010.
- SCHETELIG, M. F.; HANDLER, A. M. Transgenic embryonic sexing system for *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Insect biochemistry and molecular biology*, 42(10). p. 790-795, 2012.
- SCHETELIG, M. F.; MILANO, A.; SACCONE, G.; HANDLER, A. M. Male only progeny in *Anastrepha suspensa* by RNAi-induced sex reversion of chromosomal females. *Insect biochemistry and molecular biology* 42(1), p. 51-57, 2012.

- SELIVON, D. *Estudo sobre a diferenciação populacional em Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera, Tephritidae). Tese de Doutorado, Departamento de Biologia, Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1996.
- SELIVON, D.; PERONDINI A. L. P. Evaluation of techniques for C and ASG banding of the mitotic chromosomes of *Anastrepha* species (Diptera, Tephritidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 20(4), 1997.
- SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P. Eggshell morphology in two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Annals of Entomological Society of America*, 91, p. 473-478, 1998.
- SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; MORGANTE, J. S. Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Genetics and Molecular Biology*, 22, p. 507–510, 1999.
- SELIVON, D.; VRETOS C.; FONTES L.; PERONDINI A. L. P. New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Proceedings of the 6th International Symposium on fruit flies of economic importance, Stellenbosch, South Africa, 6-10 May 2002*. Isteg Scientific Publications, p. 253-258, 2004.
- SELIVON, D.; PERONDINI, A. L. P.; MORGANTE, J. S. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Annals of Entomological Society of America*, 98, p. 367-381, 2005.
- SOLFERINI, V. N.; MORGANTE, J. S. Karyotype study of eight species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *Caryologia*, v. 40, n. 3, p. 229-241, 1987.
- SOUZA, J. M. G. A.; GOUVEIA, M.; PERONDINI, A. L. P.; SELIVON, D. Asymmetry of frontal bristles and postocular setae in species and hybrids of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Genetics and Molecular Biology*, 30(1), p. 145-151, 2007.

- STATSOFT, Inc. *STATISTICA*, 10. Tulsa, OK, 2011.
- STECK, G. J. Biochemical systematics and population genetic structure of *Anastrepha fraterculus* and related species (Diptera: Tephritidae). *Annals of Entomological Society of America*, 84, p. 10-28, 1991.
- STECK, G. J.; SHEPPARD, W. S. Mitochondrial DNA variation in *Anastrepha fraterculus*. In: ALUJA, M.; LIEDO, P. (Org.) *Fruit Flies: Biology and Management*, Springer-Verlag, New York, p. 9-14, 1993.
- STONE, A. The fruit flies of the genus *Anastrepha*. U. S. Department of Agriculture, Miscellaneous Publication, 439, p. 1-112, 1942.
- SUGAYAMA, R.L.; MALAVASI, A. Ecologia Comportamental. In: Malavasi, A.; Zucchi, R.A. (Ed.). *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Ribeirão Preto: Holos Editora, p. 103-108, 2000.
- SUTTON, B. D.; STECK, G. J.; NORRBOM, A. L.; RODRIGUEZ, E. J.; SRIVASTAVA, P.; ALVARADO, N. N.; COLQUE, F.; LANDA, E. Y.; SÁNCHEZ, J. J. L.; QUISBERTH, E.; PEÑARANDA, A.; CLAVIJO, P. A. R.; ALVAREZ-BACA, J. K.; ZAPATA, T.; PONCE, P. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) variation in the *Anastrepha fraterculus* cryptic species complex (Diptera, Tephritidae) of the Andean region. *ZooKeys*, n. 540, p. 175, 2015.
- UPADHYAY, S.; CHANDRASHEKAR, K.; THAKUR, N.; VERMA, P.C; BORGIO, J.F.; SINGH, P.; TULI, R. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. *Journal of biosciences*, v. 36, n. 1, p. 153-161, 2011.
- VERA, M. T.; CÁCERES, C.; WORNOPORN, V.; ISLAM, A.; ROBINSON, A. S.; DE LA VEGA, M. H.; HENDRICH, J.; CAYOL, J. P. Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera, Tephritidae). *Annals of Entomological Society of America*, 99, p. 387-397, 2006.

- WHITE, I. M.; ELSON-HARRIS, M. M. *Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics*. CAB International, Wallingford, p. 601, 1992.
- WHYARD, S.; ERDELYAN C.; PARTRIDGE, A.; SINGH, A. BEEBE N.; CAPINA, R. Silencing the buzz: a new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs. *Parasit Vectors*, v. 8, p. 96, 2015.
- YU, N.; CHRISTIAENS O.; LIU J.; NIU J. CAPPELLE, K.; CACCIA, S.; HUVENNES, H.; SMAGGHE, G. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect science*, v. 20, n. 1, p. 4-14, 2013.