UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

DANIELA ZARDINI BARDELLA

Silenciamento gênico via RNAi visando o controle da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*)

Piracicaba
2015

DANIELA ZARDINI BARDELLA

Silenciamento gênico via RNAi visando o controle da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*)

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Piracicaba

2015

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Bardella, Daniela Zardini

Silenciamento gênico via RNAi visando o controle da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) / Daniela Zardini Bardella; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - Piracicaba, 2015.

80 p. : il.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biotecnologia 2. Brocas (Insetos nocivos) 3. Entomologia agrícola 4. Sequenciamento genético I. Título

CDU602.8 : 632.731

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Irineu e Cleuza
que, com muito amor e carinho nunca mediram esforços
para me apoiar e me ajudar a seguir em frente.
Deus sabe tudo o que fizeram e fazem
pela formação de seus filhos.

Minha imensa e eterna gratidão!

Dedico também aos meus irmãos, Rodrigo e Joana Helena,
que são meus maiores exemplos de cumplicidade e amor,
e foram tantas vezes meu refúgio e fonte de energia.
Aos meustios, primos, e namorado, que juntos,
constituem minha maior riqueza, a família.

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus, por me dar saúde, força, paciência e sabedoria para concluir mais esta etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira pela orientação, confiança no meu trabalho e por todo o ensinamento nestes três anos de convivência.

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, do Laboratório de Biologia de Insetos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ-USP), à técnica Neide Graciano Zério e à aluna Aline Bertin, por toda a atenção e contribuição, sem as quais, não seria possível a realização deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP: Inês Possignolo, Raquel Orsi, Felippe Campana, Wlamir Godoy e Paulo Cassieri pela atenção e auxílio dado nos momentos de necessidade, e pela amizade em todos os outros.

Aos meus parceiros de bancada: Alessandra Koltun, Aline Pedroso, Aline Peruchi, André Tagliaferro, Danielle Scotton, Eduardo Bressan, Grabriela Juliano, Jamile Silva, Joni Lima, Juliana Deganello, Juliana Leles, Karina Brandão, Layanne Souza, Lucas Anjos, Luis Henrique Damasceno, Marielle Vitti, Melissa Alves, Rodolfo Maniero e Thaísa Pinheiro, pela ótima convivência nesses anos e por deixarem meus dias mais leves.

Aos pós-docs: Eduardo Bressan, Roberto Camargo e Thais Barros, pelos valiosos ensinamentos e incentivos.

Aos amigos Flávia Bento e Fernando Ferreira pelo conhecimento não só científico transmitido a mim, pela amizade, companheirismo e toda ajuda com as minhas lagartinhas!

"Lampianos", só tenho à agradecer por cada momento compartilhado!

Ao Dr. Marcelo Brandão e Dr. Henrique Marques-Souza, pela estimada colaboração na execução do trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) pela concessão do auxílio financeiro.

Aos funcionários do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), principalmente ao pessoal da Seção de Informática e aos queridos da pós-graduação, por toda a ajuda e atenção dada.

Aos meus pais, Irineu e Cleuza, e aos meus irmãos, Rodrigo e Joana Helena, por todo carinho, atenção, companheirismo, formação, compreensão, paciência, torcida, confiança e amor incondicional! Por estarem sempre ao meu lado, me dando forças, ânimo e novas perspectivas! Amo muito vocês! Vocês são e sempre serão os alicerces da minha vida!

À toda minha família, pelo carinho, apoio e pela construção da minha pessoa. É muito amor por este amontoado de gente!

Ao meu amor, Danilo, por toda parceria, cuidado, paciência e dedicação ao longo desses anos.

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

Deixo aqui meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

BARDELLA, D. Z. **Silenciamento gênico via RNAi visando o controle da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*)**. 2015. 80 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma importante cultura na produção de alimentos e energia. Várias espécies de insetos podem causar sérios prejuízos econômicos à cultura da cana-de-açúcar. A broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) é a praga de maior relevância por estar amplamente distribuída nas regiões canavieiras. O silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) se tornou uma técnica amplamente estudada e utilizada nos mais diversos aspectos da biologia. Uma de suas aplicações é no controle de insetos-praga como uma alternativa de alta eficiência, especificidade e reduzido impacto ambiental. A ingestão de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) com identidade a regiões de genes essenciais de insetos-praga pode resultar no silenciamento destes genes, levando a fenótipos deficientes. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo buscar genes alvos para o silenciamento com potencial para impedir o desenvolvimento normal da *D. saccharalis* e estabelecer uma forma de entrega do dsRNA eficiente para o teste de genes, visando assim validar o uso da técnica para a espécie. Por meio da clonagem de regiões de genes ortólogos já utilizados como alvo de silencimento em outras espécies de insetos (*V-ATPase A*, *Receptor de Ecdisona* e *Arginina Kinase*), e de genes com função específica identificadas após a caracterização do transcritoma de *D. saccharalis* (*Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase*, *Neverland* e *Quitina Sintase*) foram conduzidos ensaios de RNAi. Foram realizados ensaios de dose resposta para o gene *V-ATPase* em lagartas neonatas, onde a concentração selecionada por causar melhor redução na expressão do gene alvo foi de 2,5 µg μL^{-1}. Esta concentração foi então utilizada em ensaios de alimentação para os outros genes. Os genes *V-ATPase A*, *receptor de Ecdisona*, *Arginina Kinase*, *Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase* e *Quitina Sintase* apresentaram redução significativa no número de transcritos em larvas, demonstrando a viabilidade do uso de RNAi em *D. saccharalis* neonatas.O gene *Neverland* não demonstrou redução no acúmulo de transcritos nas condições trabalhadas. O gene *GFP* inicialmente utilizado como controle negativo apresentou variação na expressão de genes alvo, sendo desconsiderado como bom controle para *D. saccharalis*. O silenciamento dos genes alvo requer quantidades elevadas de dsRNA, superiores aos obtidos por transcrição *in vitro*, o que limita a viabilidade de ensaios com maiores replicatas e para determinar efeitos

biológico. Alternativas de produção de dsRNA devem ser avaliadas para viabilizar a seleção de genes alvo efetivos.

Palavras-chave: Silenciamento gênico; Controle de pragas; RNA de interferência; Transcritoma.

ABSTRACT

BARDELLA, D. Z. **Silencing genes by RNAi for the control sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*).** 2015. 80 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is an important crop for the production of food and bioenergy. Many insect species can cause economic losses in sugarcane. The sugarcane borer (*Diatraea saccharalis)* is the most important sugarcane pest,because it occurs in all production regions. Gene silencing by RNA interference (RNAi) rapidly became a widely investigated approach, adopted in various aspects of biology. One of the potential applications of RNAi is agricultural pest control, as an alternative with high efficiency, specificity and reduced environmental impact. The ingestion of double-stranded RNA (dsRNA) molecules with identity to regions of essential genes of the insect-pest can result in the target gene knock-down and, consequently, to deficient phenotypes. In the present work, target genes with the potential to affect the normal development of *D. saccharalis* were searched, together with an efficient dsRNA delivery approach to test the target-genes to validate the use of the RNAi in *D. saccharalis*. Based on degenerated primers, expressed orthologous genes previously tested in other insect species (*V-ATPase A*, *Ecdisone Receptor* and *Arginine Kinase*) were cloned, while genes with specific function (*Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase*, *Neverland*, and *Chitin Synthase*) were identified from an in-house assembled transcriptome of *D. saccharalis* and cloned. A dose-response assay was conducted using the *V-ATPase* gene region delivered by droplets to neonate larvae, and the 2.5 µg μL^{-1}dsRNA concentration was selected for further tests. This concentration was then used to deliver the other genes. The dsRNA version from the genes *V-ATPase A*, *Ecdisone Receptor*, *Arginine Kinase*, *Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase* and *Chitin Synthase* exhibited a significant reduction in the accumulation of transcripts, indicating the viability of RNAi to *D. saccharalis* in 1st instar larvae.The *Neverland* gene was not silenced by RNAi in the used conditions. The dsRNA of the *Green Fluorescent Protein* gene, used as negative control appeared to affect other gene targets. Target gene silencing require large amounts of dsRNA, more than what is achievable by *in vitro* transcription, which limits the viability to conduct large assays with more replicates and to determine biological effects. Alternatives to produce dsRNA need to be evaluated to enable the selection of effective target genes.

Keywords: Gene silencing; Pest control; RNA interference; Transcriptome.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. REVISÃO DA LITERATURA 15
2.1. Descrição do gênero *Diatraea* 15
2.2. Biologia de *Diatraea saccharalis* 15
2.3. Métodos de controle da broca da cana-de-açúcar 17
2.4. Silenciamento gênico por RNAi 18
2.5. Aplicações na agricultura 21
2.6. Seleção dos genes alvo do silenciamento 23
3. MATERIAIS E MÉTODOS 26
3.1. Criação de *Diatraea saccharalis* 26
3.2. Clonagem de genes candidatos 27
3.2.1. Escolha de genes candidatos e desenho de *primers* 27
3.2.2. Extração de RNA de *Diatraea saccharalis* 28
3.2.3. Síntese de cDNA 29
3.2.4. Amplificação dos genes alvos e inserção em vetor de clonagem 29
3.3. Caracterização do transcritoma de *Diatraea saccharalis* 30
3.3.1. Extração de RNA de *Diatraea saccharalis* para sequenciamento massivo 30
3.3.2. Montagem do transcritoma de referência a partir dos dados de sequenciamento RNA-seq 31
3.4. Novos genes alvos para silenciamento de *Diatraea saccharalis* 31
3.4.1. Escolha dos novos alvos 31
3.4.2. Clonagem dos novos genes candidatos 32
3.5. Seleção de método para entrega de dsRNA para o inseto 32
3.6. Ensaio de RNAi em *Diatraea saccharalis* 36
3.6.1. Síntese de dsRNA a partir dos genes clonados 36
3.6.2. Ensaio de fornecimento de dsRNA a *Diatraea saccharalis* 37
3.6.3. Extração de RNA e síntese de cDNA de *Diatraea saccharalis* para análise de expressão gênica 38
3.6.4. Análise quantitativa de amplificação de transcritos reversos (RT-qPCR) 38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 41
4.1. Genes alvos iniciais para o silenciamento de *Diatraea saccharalis*: escolha e clonagem 41
4.2. Caracterização do transcritoma de *Diatraea saccharalis* 45

4.3. Novos genes alvos para o silenciamento de *Diatraea saccharalis*: escolha e clonagem .. 50
4.4. Avaliação de métodos de entrega do dsRNA para o inseto 54
4.5. Ensaios de RNAi em *Diatraea Saccharalis* 57
4.5.1. Entrega de dsRNA via gota para lagartas de 4° instar 59
4.5.2. Dose resposta por gota em lagartas neonatas 64
4.5.3. Via Gota em lagartas neonatas com todos os genes 67
5. CONCLUSÕES 71
REFERÊNCIAS 72

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma importante cultura para a produção de alimentos e energia, pois possui capacidade de acumular altos teores de sacarose e fibra em seus colmos, além de se destacar pelo alto rendimento agrícola e de biomassa. O bagaço era tratado até recentemente como resíduo gerado dos processos de produção de açúcar e álcool, porém ganhou destaque na geração de energia, na indústria de papel, indústria química, plásticos biodegradáveis e será utilizado na produção de etanol de segunda geração. O Brasil se destaca como maior produtor mundial de cana-de-açúcar, produzindo 634,8 milhões de toneladas na safra 2014/2015 (CONAB, 2015). Esse cenário tem motivado a contínua expansão da cultura, com a qual se acentuam os problemas de pragas e doenças que causam prejuízos econômicos ao setor sucroalcooleiro. Aliado a isso, a ampliação do uso da colheita mecanizada ("cana crua") tem levado a uma maior incidência de insetos-praga.

A broca *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera: Crambidae) é uma das mais importantes pragas da cana-de-açúcar no Brasil, e está amplamente distribuída em todas as regiões canavieiras do país. O dano causado pelas lagartas resulta da abertura de galerias no interior dos colmos, causando morte de grande número de perfilhos quando o canavial é jovem e acentuada redução de produtividade em canaviais mais desenvolvidos. Os colmos atacados perdem massa, são menores e finos, muitos secam e morrem, enquanto outros se quebram pela ação do vento. Aos danos diretos causados pelas brocas, devem-se adicionar os indiretos, uma vez que os orifícios feitos pelas lagartas permitem a entrada de pragas secundárias, como *Metamasius hemipterus* (L.) (Coleoptera: Curculioniodae), que acentuam as perdas no campo, e diversos patógenos, especialmente fungos (*Fusarium moniliforme* e *Colletotricum falcatum)*, que causam a "podridão vermelha", com redução do teor de açúcar nos colmos devido à inversão da sacarose armazenada na planta e sua transformação em glicose e levulose. Na indústria, esses microrganismos presentes no colmo contaminam o caldo, prejudicando os processos industriais, por dificultar a obtenção de açúcar de qualidade e inibir a fermentação. Para algumas variedades, a cada 1% de intensidade de infestação da broca, as perdas podem atingir 1,14% na produtividade de colmos, 0,42% na produtividade de açúcar e 0,21% na produtividade de álcool (CANAOESTE, 2013), ilustrando a importância da praga para a cultura.

O manejo da broca da cana é principalmente realizado por controle químico ou biológico. O controle químico é realizado com aplicações de inseticidas, porém a eficácia

desta abordagem é influenciada pela dificuldade de se atingir as lagartas, sendo que alguns dias após a eclosão penetram no colmo onde permanecem por todo o desenvolvimento larval causando danos. Já o controle biológico está baseado na liberação de parasitóides. Embora outras medidas de controle possam ser adotadas, em geral elas são utilizadas de maneira integrada ao controle biológico. Alguns dos mecanismos para o desenvolvimento de novas técnicas de controle de pragas baseiam-se na manipulação da população do inseto-praga, como, por exemplo, a introdução de machos estéreis ou uso de armadilhas de feromônio, como das modificações da cultura, por meio da introdução de cultivares resistentes por transgenia.

Neste contexto, podemos destacar o uso do silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) que, desde sua primeira descrição, vem sendo amplamente explorada em estudos de genômica funcional por meio dos efeitos do silenciamento de genes-alvo. A ingestão de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) homólogas a regiões de genes essenciais de insetos-praga pode resultar no silenciamento do respectivo gene, resultando em fenótipos que podem variar entre alterações no desenvolvimento, perda do apetite, infertilidade ou até morte. Portanto, a abordagem de RNAi oferece grande potencial no controle de pragas agrícolas. Para *D. saccharalis*, o uso de RNAi foi demonstrado por Yang et al. (2010; 2011), que utilizaram esta ferramenta para analise funcional de enzimas digestivas associadas à resistência a proteína Cry1Ab do *Bacillus thuringiensis* em milho.

Com foco diferente, considerando a importância econômica da cana de açúcar para o Brasil e visando a obtenção de uma nova estratégia aplicável no futuro para o controle da broca da cana-de-açúcar através da técnica de RNA de interferência, o objetivo do presente trabalho foi buscar alvos para o silenciamento gênico com potencial para impedir o normal desenvolvimento da praga e estabelecer uma forma de entrega do dsRNA eficiente para o teste de genes, visando assim validar o uso da técnica para a *D. saccharalis*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Descrição do gênero *Diatraea*

No mundo existem mais de 1.500 espécies de insetos que se alimentam da cana-de-açúcar, e deste total, larvas de mais de 50 espécies de lepidópteros são reconhecidas como praga para a cultura (LONG; HENSLEY, 1972). No Velho Mundo, predominam os gêneros *Chilo* e *Sesamia*; já nas Américas, se destacam as espécies do gênero *Diatraea*. A *D. saccharalis*, descrita por Fabricius em 1794, é a mais importante espécie encontrada no hemisfério ocidental (LONG; HENSLEY, 1972). Existem cerca de 21 espécies do gênero *Diatraea* ocorrendo em cana-de-açúcar no continente americano, porém nem todas as espécies causam danos à cultura, deste total, duas espécies são importante como inseto-praga: *D. saccharalis*, com ocorrência em todo o país e *Diatraea flavipennella* Box, encontrada no Rio de Janeiro, Minas Gerais e nos estados nordestinos, onde apresenta maior importância (MENDONÇA, 1996). A broca da cana-de-açúcar *D. saccharalis* tem sua distribuição geográfica entre 30° de latitude Norte e 30° Sul, estando presente em todos os estados onde se cultiva cana-de-açúcar. Além da cana-de-açúcar, a *D. saccharalis* ataca diversas gramíneas, como sorgo, milho, arroz e algumas ciperáceas (MENDONÇA, 1996).

2.2. Biologia de *Diatraea saccharalis*

A broca da cana é um inseto de desenvolvimento holometabólico, isto é passam pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto (DINARDO-MIRANDA, 2008). O adulto da broca da cana é uma mariposa com cerca de 25 mm de envergadura, com as asas anteriores apresentando coloração amarelo-palha, com alguns desenhos pardacentos e as asas posteriores são esbranquiçadas (GALLO et al., 2002). Segundo Perez e Long (1964), as fêmeas da broca da cana-de-açúcar começam a emitir feromônio sexual logo após sua emergência, sendo mais atrativas durante os três primeiros dias da fase adulta, e interrompendo a atração dos machos após serem copuladas, chegando a depositar certa de 300 ovos no total. Walker (1965) estudou o comportamento de cópula de *D. saccharalis* e verificou que a fêmea inicia a atração sexual após o pôr do sol, podendo tanto o macho como a fêmea acasalar mais de uma vez durante a vida, mas geralmente apenas uma por noite. O horário de maior atividade de cópula ocorre à noite e a postura é feita antes do amanhecer.

As fêmeas ovipositam tanto na face inferior como na superior do limbo foliar e, ocasionalmente, na bainha das folhas. A postura é feita em massa, com disposição imbricada, onde um ovo de formato oval e achatado cobre 2/3 ou a metade do que vem logo a seguir (LIMA FILHO, LIMA, 2001). A duração da fase de ovo varia, principalmente, em função da temperatura, sendo nas condições brasileiras por volta de nove dias (BOTELHO, MACEDO, 2002). A coloração inicial dos ovos é amarelo-pálida, e com o desenvolvimento embrionário, adquirem tonalidade rósea até chegar ao marrom-escuro, quando é possível visualizar as cápsulas cefálicas.

Após a eclosão, a lagarta se dirige para a região do cartucho da planta à procura de abrigo e alimenta-se através da raspagem das folhas ou da casca do entrenó em formação, permanecendo ali por uma a duas semanas, sofrendo uma ou duas ecdises, quando inicia a perfuração do colmo (BOTELHO, MACEDO, 2002). O orifício de entrada da broca geralmente localiza-se próximo à base do entrenó, na porção mais mole, perfurando uma galeria no sentido ascendente na região do palmito da planta. Ocasionalmente, as lagartas podem construir galerias circulares, no sentido transversal, enfraquecendo o colmo e tornando-o muito mais suscetível à quebra ou ao acamamento (BOTELHO, MACEDO, 2002).

Durante o período larval, o inseto sofre de cinco a seis ecdises. Ao atingirem o completo desenvolvimento larval, em média aos 40 dias, medem de 22 a 25 mm de comprimento, com coloração amarelo-pálida e cabeça marrom. Possuem três pares de pernas torácicas, quatro pares de falsas pernas abdominais e um par de falsas pernas anais (GALLO et al., 2002). Antes de se transformarem em pupas, as lagartas abrem um orifício para o exterior do colmo da cana, fechando-o com fios de seda e serragem. As pupas medem cerca de 17 mm de comprimento e 4 mm de largura. Inicialmente, possuem coloração marrom clara, mas com o desenvolvimento vão adquirindo coloração mais escura; esse estágio dura de 9 a 14 dias. O adulto emerge pelo orifício anteriormente feito pela lagarta. O ciclo biológico completo leva de 53 a 60 dias (GALLO et al., 2002). Uma das grandes adversidades enfrentadas pela cultura de cana-de-açúcar é que o dano causado por essa praga ocorre praticamente durante todo o período de desenvolvimento do inseto.

2.3. Métodos de controle da broca da cana-de-açúcar

Embora várias medidas de controle possam ser adotadas, o manejo da broca da cana *D. saccharalis*, está baseado na liberação de parasitóides, sendo esse um dos exemplos mundiais de eficiência de controle biológico (DINARDO-MIRANDA, 2008). No Brasil, desde a década de 1970, quando se iniciaram trabalhos de pesquisa e liberação de parasitóides, tanto pelo antigo Planalsucar como pela antiga Copersucar, o manejo das populações de *D. saccharalis* tem sido feito por métodos biológicos, visando à fase larval da praga (MACEDO; BOTELHO, 1988). Inicialmente, os parasitóides produzidos e liberados eram moscas nativas *Lydella minense* (Towns.) e *Paratheresia claripalpis* (Wulp.) (Diptera: Tachinidae), e a vespa introduzida *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). Com o tempo, *C. flavipes* mostrou-se mais eficiente e passou a ser praticamente a única espécie produzida e liberada em larga escala para o controle de *D. saccharalis* (COPERSUCAR, 1992). Porém, em determinadas situações, a *C. flavipes* pode não ser tão eficiente, particularmente quando a predação de ovos é baixa ou em locais onde este parasitóide larval não se adapta (regiões mais secas) (PARRA; ZUCCHI, 2004), havendo necessidade de se utilizarem outros métodos para combatê-la (PINTO, 1999). Atualmente, alguns produtores incrementam o controle biológico de *D. saccharalis* liberando também *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), um parasitóide de ovos, que em associação com a *C. flavipes,* garantem maior sucesso na diminuição da pressão da praga e, consequentemente, seus prejuízos (BOTELHO et al., 1999).

O controle químico é utilizado em certas regiões onde as populações de *D. saccharalis* aumentaram muito nos últimos anos em decorrência de vários fatores, como o aumento das áreas de plantio, uso de cultivares mais susceptíveis e, principalmente, pela não adoção do controle biológico (DINARDO-MIRANDA, 2008). Contudo, a adoção de inseticidas é bastante polêmica, pois esses produtos podem afetar os inimigos naturais, que são importantes reguladores das populações de *D. saccharalis.* Desta forma, os inseticidas utilizados para o controle da broca da cana são fisiológicos, com menor impacto ambiental e são restritos a áreas que apresentam intensidades de infestação finais muito altos e índices de parasitismo baixos (DINARDO-MIRANDA, 2008).

Também pode ser adotado o controle cultural por manejo que é baseado no uso de variedades tolerantes ao ataque da praga, optando, por exemplo, por uma variedade mais fibrosa que impede a lagarta de penetrar no colmo, na eliminação de plantas hospedeiras nas

proximidades do canavial, como milho e milheto, no corte da cana sem desponte e, na moagem rápida após o corte (GALLO et al, 2002).

Nos últimos anos, o manejo da *D. saccharalis* tem se tornado mais difícil devido à adoção da colheita mecanizada em São Paulo. A queimada da cana-de-açúcar contribui indiretamente para o controle da broca, eliminando a praga remanescente do canavial (EMBRAPA, 2009). Na ausência da queima da cana-de-açúcar, os índices de infestação da broca e de outros predadores aumentaram significativamente (ALAN et al., 1980, MACEDO; ARAÚJO, 2000).

Outra opção para o controle de *D. saccharalis* que vem sendo estudada pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) é o uso de cana transgênica, modificada geneticamente com a inclusão do gene "Cry" que codifica proteínas Bt, que são entero-tóxicas espécie-específica, capaz de dar à planta resistência as lagartas, que morrem por inanição. Este cultivar tem previsão de lançamento para o início de 2017, porém o dossiê com os estudos da variedade ainda não foi submetido à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) (REVISTA CANAVIEIROS, 2015).

O emprego da abordagem de RNA de interferência (RNAi), que decorre do fornecimento de RNA dupla fita (dsRNA) com sequência homóloga a um gene-alvo do inseto causando o silenciamento gênico, surgiu como grande potencial de controle de pragas agrícolas. A produção de plantas transgênicas exibindo resistência a insetos-praga demonstrou esse conceito (BAUM et al., 2007; MAO et al., 2007), e tem sido explorado para diversos sistemas.

2.4. Silenciamento gênico por RNAi

O mecanismo de silenciamento gênico baseia-se na introdução de moléculas dupla fita de RNA homólogas a genes endógenos. Em todos os organismos, as moléculas de RNA estão presentes na forma de fita simples. Porém, alguns vírus possuem o seu código genético na forma de RNA fita dupla, e sua infecção é dada pela introdução deste RNA fita dupla (dsRNA, do inglês *double stranded RNA*) nos organismos. Portanto, a ocorrência de dsRNA nas células dos organismos infectados representa na maioria das vezes a presença de um agente prejudicial à sua sobrevivência. Com isso, a evolução da maquinaria celular dos organismos infectados acabou selecionando um processo de defesa contra o ataque de vírus, que se baseia na degradação específica do dsRNA presente em suas células (HANNON, 2002).

Uma vez detectada a presença de dsRNA no citoplasma, a enzima Dicer, uma RNAse do tipo III, se liga ao dsRNA e digere a fita dupla do RNA em fragmentos de cerca de 20 pares de base (Figura 1). Estas moléculas, denominadas de siRNA (*small interfring RNA*) são então associadas a um complexo ribonucléico denominado RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*). Neste complexo, uma das fitas do siRNA é eliminada e a outra é mantida e utilizada como guia para o reconhecimento de sequências complementares à ela presentes na célula. O complexo RISC irá utilizar o molde do dsRNA exógeno introduzido nas células hospedeiras, agora na forma de fita simples, para reconhecer e degradar todas as moléculas de RNA presentes na célula complementares a ele (PRICE, GATEHOUSE, 2008; KOLA et al., 2015) (Figura 1). Portanto, a expressão endógena de qualquer gene, na maioria dos organismos vivos, pode potencialmente ser silenciada por meio da introdução de dsRNA complementar a este gene (GORDON et al., 2007; PRICE, GATEHOUSE, 2008). Sem a presença de moléculas intactas de mRNA, a produção da proteína não ocorrerá e a expressão do gene endógeno é inativada (FIRE et al. 1998).

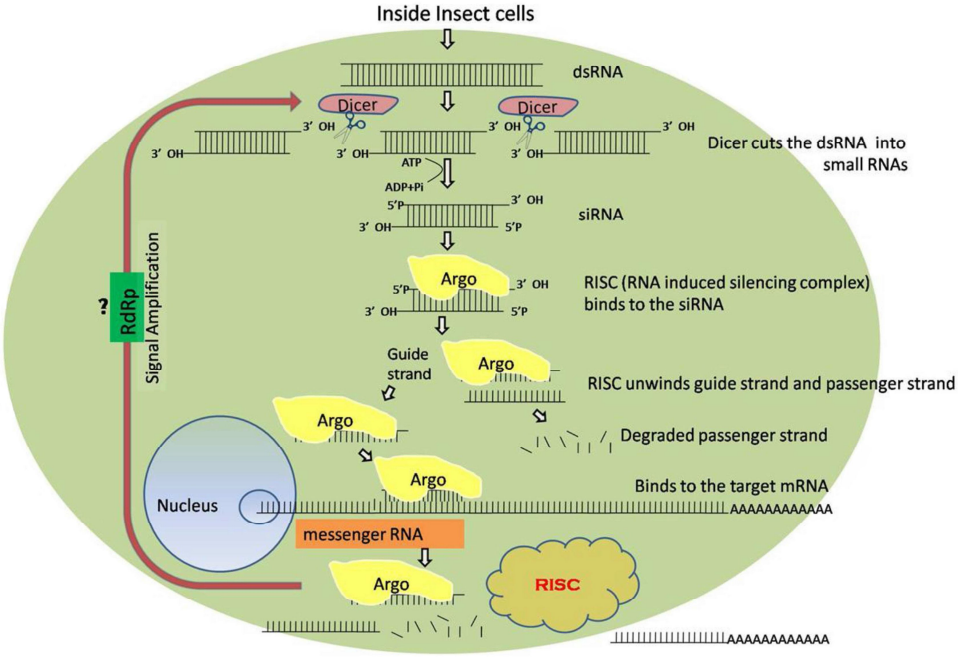

Figura 1 – Ilustração do mecanismo de silenciamento de genes por RNAi no interior de células de insetos (KOLA et al., 2015).

O principal desafio é encontrar métodos eficientes e confiáveis de entrega de dsRNA as células alvo do inseto (YU et al., 2013). As estratégias que tem sido aplicadas em trabalhos com RNAi com insetos se subdividem em três principais: microinjeção, sendo o método mais

utilizado para a entrega do dsRNA em larvas de insetos (GARBUTT; REYNOLDS, 2012, YANG; HAN, 2014a); ingestão de dsRNA, seja por alimentação por gota, misturado diretamente em dieta ou por plantas transgênicas que expressam o dsRNA (ZHU et al., 2010; TIAN et al., 2009; BAUM et al., 2007); e por imersão do organismos em solução de dsRNA, aplicável em alguns casos, principalmente em cultura de células (ARONSTEIN et al., 2006).

O mecanismo de interferência por RNA pode ser autônomos ou não autônomo, e ambos são necessários para a persistência do efeito de silenciamento. Para RNAi autônomo, o processo de silenciamento está limitado à célula na qual o dsRNA é introduzido ou expresso e, o processo de RNAi atinge apenas células individuais (ZHANG et al., 2013). O efeito de interferência não autônomo pode ocorrer em diversos tecidos e células a partir do local de aplicação ou produção de dsRNA. Existem dois tipos de interferência não autônoma: de caráter ambiental e sistêmico. Interferência de caráter ambiental descreve todos os processos em que o RNA é captado por uma célula a partir do ambiente, enquanto a interferência de caráter sistêmico refere-se a todos os processos em que o sinal de silenciamento é transportado a partir da célula em que o dsRNA é aplicado ou expresso para outras células e tecidos, onde o silenciamento terá efeito (ZHANG et al., 2013).

Embora RNAi seja um mecanismo conservado, a ordem de insetos apresentam diferenças nos mecanismos e modo de ação. Três genes, *Sid-1*, *Sid-2*, e *Sid-3* (*Systemic RNA-Inteference Defective*) foram identificados em *Caenorhabditis elegans*, necessários para o efeito sistêmico de RNAi (WINSTON et al., 2002). A proteína SID-1 foi caracterizada como uma proteína transmembranar, que funciona como um poro ou canal que transporta siRNA/dsRNA para dentro ou fora das células (KOLA et al., 2015). *Sid*-1 ou outro homólogo não foi identificado em *Drosophila melanogaster*, que até então não foram apresentados efeitos de RNAi sistêmico (KOLA et al., 2015). A sinalização do RNAi em insetos foi demonstrada em algumas espécies, como em *Hyalophora cecropia* e *Bombyx mori*, onde a injeção de dsRNA em pupas resultaram em efeitos fenotípicos no desenvolvimento embrionário da geração seguinte, indicando a captação do dsRNA no desenvolvimento dos órgãos germinativos da pupa (WANG et al., 2011).

Além disso, a natureza sistêmica de RNAi também é determinada pela presença ou ausência de uma agente amplificador de siRNA, a enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRP, do inglês *RNA dependent RNA polymerase*), que auxilia na amplificação do sinal de silenciamento (KOLA et al., 2015). Os domínios característicos da RdRP não foram identificados no genoma de insetos disponíveis; no entanto, *Tribolium castaneum*, um

escaravelho vermelho da farinha, mostra uma forte resposta sistêmica e permanente de silenciamento. Curiosamente, *Tribolium* apresenta amplificação de RNA através de um mecanismo possivelmente distinto do que a observada em *C.elegans* (TOMOYASU et al., 2008).

Atualmente, a técnica de RNAi tem sido amplamente utilizada no campo da biologia do desenvolvimento, genética funcional e da entomologia agrícola. Apesar de variações quanto à presença ou funcionalidade de determinados componentes deste mecanismo, o princípio de silenciamento é muito semelhante em todos os casos estudados. De um modo geral, os trabalhos utilizam esta abordagem para a caracterização dos mecanismos de ação do RNAi e principalmente para o estudo da função e regulação gênica em organismos modelos, como a mosca-da-fruta *D. melanogaster* (ROIGNANT et al.., 2003; BISCHOFF et al., 2006; MILLER et al., 2008), o besouro *T. castaneum* (TOMOYASU, DENELL, 2004; SAVARD et al., 2006; MARQUES-SOUZA et al., 2008) e do bicho da seda *B. mori* (QUAN et al., 2002; OHNISHI et al., 2006). Por proporcionar uma ação eficiente e gene espécie específica, estudos sugerem que dsRNA poderia ser aplicado como agente inseticida feito sob medida (WHYARD et al., 2009). A probabilidade de o inseto adquiri resistência pode ser contornada pela construção de dsRNA de uma região diferente do mesmo gene ou de um outro gene (YU et al., 2013).

2.5. Aplicações na agricultura

Os primeiros estudos usaram microinjeção para entregar dsRNA em insetos, mas a demonstração de que a absorção através da ingestão de dsRNA era suficiente para silenciar genes alvos, abriu a possibilidade de aplicar esta abordagem em uma maior escala (KOCH, KOGEL, 2014). O potencial de aplicação de RNAi para controle de insetos pragas agrícolas tornou-se logo evidente (GORDON et al., 2007). Aplicação de dsRNA por pulverização se assemelha ao atual método de dispersão de inseticida numa cultura, mas os custos de produção de RNA e estabilidade no nível tecnológico atual ainda limitam sua eficácia (KATOCH et al., 2013). No entanto, com a demonstração de que as plantas transgênicas modificadas para expressar dsRNA de insetos podem proteger as culturas e controlar a praga alvo com sucesso (BAUM et al., 2007; MAO et al., 2007) surgiu a possibilidade de desenvolver uma técnica de proteção de plantas mediada por RNAi.

Baum et al. (2007) primeiro testaram a sensibilidade das larvas do coleóptero *Diabrotica virgifera virgifera*à ingestão de dsRNAs relativo a diversos genes, tais como ATPase vacuolar, subunidades A, D e E, assim como alfa-tubulina em diversas concentrações em um ensaio de alimentação por 12 dias com dieta artificial, com o objetivo de selecionar um vasto repertório de genes essenciais ao inseto. Dos 290 dsRNA testados, a ingestão de 125 deles resultaram em retardo significativo no desenvolvimento ou morte das larvas. Este silenciamento gênico específico para os genes em questão foi confirmado por meio de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR). Posteriormente, uma região do gene que codifica a subunidade A da ATPase vacuolar numa versão que expressa a região em forma de grampo (*hairpin*) de modo a gerar o dsRNA foi utilizado para a transformação de plantas de milho e submetidas a infestação por *D. v. virgifera*. Uma vez transformadas, tais plantas apresentaram níveis consideráveis de proteção quando comparadas com a planta controle, mostrando a viabilidade da técnica. Em outro ensaio, também realizado por Baum et al. (2007), os mesmos dsRNA utilizados em *D. v. virgifera* foram testados em duas outras espécies de insetos, com a mortalidade decrescendo significantemente conforme a diminuição da similaridade das sequências gênicas ortólogas, mostrando que o silenciamento pode ser específico para o inseto-praga.

Já Mao et al. (2007) seguiram uma abordagem distinta, demonstrando que a tolerância das larvas de *Helicoverpa armigera* ao gossipol (terpenóide presente no algodoeiro) é devido à atividade de um citocromo P450 monooxigenase, que possui a capacidade de detoxificar xantotoxinas, como o gossipol. Ao alimentar as larvas com dieta artificial de plantas de tabaco e de *Arabidopsis* expressando o dsRNA do gene citocromo P450 monooxigenase, foi observado uma redução significativa na expressão deste gene. Quando essas larvas eram alimentadas em dieta contendo gossipol, foi observado um significativo retardo do crescimento. Em outro trabalho deste mesmo grupo, foram geradas plantas transgênicas de algodão expressando o dsRNA do gene de P450 monooxigenase, tendo estas plantas apresentado uma maior resistência a *H. armigera*, comprovando novamente a eficiência da técnica (MAO et al., 2010).

O uso de RNA de interferência em *D. saccharalis* visou o estudo funcional de enzimas digestivas associadas à resistência ao Bt (YANG et al., 2010; 2011). Com este foco, alimentando lagartas de diferentes instars com dsRNA para os genes alvos, foi avaliada a variação de expressão gênica em cepas resistentes e suscetíveis à proteína Cry1Ab presentes no milho Bt.

A abordagem de interferência por RNA para silenciar genes com o objetivo de controlar pragas têm utilizado dois métodos de introdução do dsRNA: a microinjeção no trato digestório, como por exemplo, em *Spodoptera exigua* para o gene de *Quitina Sintase* A (CHEN et al., 2008) e em *Phyllotreta striolata* para o gene do receptor olfativo (ZHAO et al., 2011). Alternativamente, o dsRNA tem sido introduzido por meio de ensaios de ingestão em dieta artificial, como por exemplo, para *S. exígua* para o gene de *Quitina Sintase* A (TIAN et al., 2009); *Nilaparvata lugens* para o gene de trealose fosfato sintase (CHEN et al., 2010), *Bactrocera dorsalis* (LI et al., 2011); em *Leptinotarsa decemlineata* (ZHU et al., 2010), em *Phyllotreta striolata* para o gene *arginina quinase* (ZHAO et al., 2008) e em *Bemisia tabaci* nos genes *ADT/ATP translocase*, *alfa-tubulina*, proteína ribossomal L9, *V-ATPase*, subunidade A e para um ortólogo da *actina* (UPADHYAY et al., 2011). Ainda Rosa et al. (2010) utilizaram RNAi para silenciar o gene de *Actina* em cultura de células de *Homalodisca vitripennis* via transfecção.

2.6.Seleção dos genes alvo do silenciamento

Existem vários fatores que influenciam no sucesso e eficiência da técnica de RNAi, dentre eles estão a escolha do gene, o tamanho e a região da sequência do dsRNA, a concentração fornecida, entre outros (PEREIRA, 2013). Dentre estes, se destaca a escolha dos genes alvos, que devem ser selecionados cuidadosamente seguindo alguns critérios, como:

1.Essencialidade: O efeito do silenciamento gênico deverá impor-se ao desenvolvimento normal do inseto alvo de forma eficaz. Com isso, os genes selecionados deverão desempenhar funções essenciais durante este processo (HUVENNE et al, 2010; MAO et al., 2007).

2. Especificidade: O efeito do silenciamento gênico deverá ser específico para o inseto praga buscando a utilização de genes que, apesar de serem essenciais para o inseto, apresentem uma variação significativa em sua sequência de nucleotídeos quando comparado a ortólogos em outras espécies de insetos não alvos. Entretanto, a similaridade na sequência protéica entre diferentes espécies pode ser total, uma vez que a especificidade do silenciamento gênico depende somente da sequência de nucleotídeos (BAUM et al., 2007).

3. Redundância gênica: Deverá ser evitada a utilização de genes que apresentem parálogos na espécie alvo, uma vez que a função protéica do gene alvo pode ser substituída por outro que possua variação suficiente em sua sequência de nucleotídeos para não ser

afetado pelo silenciamento gênico. Esta restrição inclui famílias gênicas e formas alternativas de *splicing* (PRICE, GATEHOUSE, 2008; PEREIRA, 2013)

Apesar da grande importância agrícola da *D. saccharalis*, existe um número limitado de sequências gênicas disponíveis no banco NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), sendo apenas 353 sequências depositadas até o momento (setembro de 2015). Entre elas, representantes de genes como: citocromo, beta-glucanase, caderina, genes de alcalina fosfatase, citocromo oxidase, NADH dehidrogenase, aminopeptidase, alfa-amilase, tripsina, polipeptidase viral, proteínas não estruturais, genes de RNA ribossomal e sequências de marcadores tipo microssatélites.

Com isso, duas abordagens podem ser seguidas e serão abordadas no presente trabalho. Primeiro, o estudo poderá utilizar a informação das sequências de genes candidatos reveladas em espécies filogeneticamente relacionadas para tentar clonar a sequência homólogas deste gene na espécie praga, no nosso caso *D. saccharalis*. Apesar de ser uma abordagem de aplicação imediata, ela depende da clonagem do gene por *primers* (iniciadores da PCR – reação em cadeia da polimerase) degenerados. Esta técnica é limitada pela necessidade de se haver um alto nível de conservação entre os aminoácidos das sequências homólogas para que a clonagem seja bem sucedida.

A segunda abordagem seria a identificação das sequências gênicas diretamente na espécie praga por meio da análise de sequências transcritas (transcritoma). As novas plataformas de sequenciamento massivo (*Next Generation Sequencing*- NGS) representam um dos principais métodos de identificação do transcritoma de um organismo ou em um tecido específico. Isso possibilita a análise de milhões de sequências em paralelo com alta sensibilidade (DESCHAMPS; CAMPBELL, 2010). Quando comparado à tecnologia tradicional para geração de ESTs, as atuais tecnologias de sequenciamento Roche 454, Illumina e Solid, fornecem importantes vantagens (DESCHAMPS; CAMPBELL, 2010). Dentre elas estão à maior amostragem do genoma e a ausência do desenvolvimento de bibliotecas de cDNA (MOROZOVA; MARRA, 2008). Além disso, possibilitam que amostragens de diversos tecidos possam ser analisadas simultaneamente (NOVAES et al., 2008; MOROZOVA; MARRA, 2008). Essa tecnologia tem o custo do sequenciamento reduzido na ordem de 100 vezes devido à análise de um genoma completo ser realizada em sua totalidade em poucas corridas (MARDIS, 2008; NORDBORG; WEIGEL, 2008).

No caso de genomas de espécies não modelo contendo um número reduzido de sequências disponíveis em bancos de dados para comparação, como é o caso da *D. saccharalis*, a tecnologia Illumina pode gerar centenas de milhares de sequências de alta

qualidade e de forma representativa de todas as regiões do transcrito independente do seu tamanho e nível de expressão (NORDBORG; WEIGEL, 2008).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Criação de *Diatraea saccharalis*

A colônia de criação de *D. saccharalis* está estabelecida no laboratório Biologia de Insetos do Prof. José Roberto Postali Parra, Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ, crescida sob temperatura de 25 ± 2 ^{o}C, umidade em torno de 60% UR e fotofase de 14 h. As lagartas recém eclodidas são crescidas por cerca de 35 dias individualmente em tubos de vidro contendo 10 mL de dieta artificial (Tabela 1) (PAULILLO, 2012), tampadas com algodão hidrófilo.

Tabela 1 – Composição da dieta artificial usada para *Diatraea saccharalis* para o preparo de 1 L de dieta.

Componente	Quantidade por Litro
Açúcar	52,5g
Farelo de soja	54g
Germe de trigo	15g
[1]Sais de Wesson	7,5g
Ácido ascórbico	1,9g
Cloreto de colina	0,4g
[2]Solução vitamínica	11,3mL
Vita Gold® (Fabiani Saúde Animal)	0,4mL
Nipagin	3g
Tetraciclina	0,13g
Formaldeído (40%)	0,75mL
Ágar	12g
Água destilada	900 mL

1- Os Sais de Wesson contém os seguintes ingredientes: carbonato de cálcio (10,5 g); sulfato de cobre ($5H_2O$) (0,019 g); sulfato de magnésio (4,5 g); sulfato de potássio e alumínio (0,005 g); iodeto de potássio (0,003 g); cloreto de sódio (5,25 g); fosfato tricálcico (7,45 g); fosfato férrico (0,725 g); sulfato de manganês (0,01 g); cloreto de potássio (6 g); monofosfato de potássio (15,5 g); fluoreto de sódio (0,028 g) e água destilada para 100 mL.

2- Segundo informações fornecidas pelo Laboratório de Entomologia da ESALQ/USP, a soluçãovitamínica contém os seguintes componentes: biotina (0,02 mg); ácido fólico (0,25 mg); piridoxina (0,25 mg); tiamina (0,25 mg); riboflavina (0,5 mg); pantotenato de cálcio (1 mg); niacinamida (1 mg); vitamina B_{12} (0,002 mg) e inositol 20 mg. Todos os componentes do complexo vitamínico podem ser adquiridos no mercado nacional e são formulados em via úmida (vitamina B_{12}) ou via seca (os demais). Para obter a solução vitamínica devem-se misturar as duas vias em um litro de água destilada e após sua utilização, conservá-la em ambiente refrigerado.

Após a pupagem, os insetos têm seu gênero identificado e são transferidos em casais para gaiolas de postura montadas com tubos de PVC forrado com papel sulfite, onde os adultos emergem, cruzam e ovipositam nas paredes do tubo. Na parte central da gaiola, se localiza o recipiente contendo alimentação para adultos de lepidópteros, composta de uma solução 10% mel (sacarose). Os ovos são retirados após a postura e armazenados no próprio papel sulfite recortado da parede da gaiola, em placa de Petri até a eclosão das lagartas.

3.2. Clonagem de genes candidatos

3.2.1. Escolha de genes candidatos e desenho de *primers*

Inicialmente, dois genes-alvo, *V-ATPase subunidade A* (*V-ATPase*) e *Arginina Kinase* (*AK*), foram escolhidos baseado em casos de sucesso do uso da técnica de RNAi para o controle de pragas nos coleópteros *D. virgifera virgifera* e *Phyllotreta striolata*, respectivamente (BAUM et al., 2007; ZHAO et al., 2008). O gene codificador para o receptor de Ecdisona (*EcR*) foi escolhido baseado no seu papel fundamental durante o processo de ecdise em *H. armigera*, onde larvas alimentadas com tabaco transformado para expressar dsRNA do gene *EcR* apresentaram ecdise defeituosa e mortalidade (ZHU et al., 2012).

Estes três genes foram previamente selecionados pelo Dr. Roberto Camargo, membro do Laboratório de Melhoramento de Planta do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), em paralelo com seu estudo envolvendo a *Tuta absoluta* (CAMARGO, 2014). As clonagens dos genes *V-ATPase* e *EcR* foram realizadas pelo Dr. Roberto Camargo, enquanto que o gene *AK* não havia sido clonado até o inicio deste trabalho, apenas os *primers* a serem utilizados em sua clonagem.

Para o desenho dos iniciadores genes específicos, sequências de aminoácidos dos genes-alvo (*V-ATPase*, *EcR* e *AK*) de outras espécies de insetos, incluindo *T. castaneum, D. melanogaster, Aedes aegypti, B. mori, M. sexta* e *Leptinotarsa decemlineata*, presentes no banco de dados NCBI foram alinhados utilizando-se o programa CLUSTALW2 (LARKIN et al., 2007) para a identificação das regiões conservadas. Estas regiões conservadas foram analisadas visualmente quanto à degeneração de códons codificadores dos aminoácidos para o desenho de *primers*. Enquanto que os aminoácidos Metionina e Triptofano apresentam apenas uma opção de códon, que significa uma degeneracidade igual a 1, Leucina e Arginina possuem 6 combinações de nucleotídeos codificadores para cada um dos aminoácidos, o que resulta em uma degeneracidade igual a 6. As regiões com degeneracidade total menor que

1024 foram selecionadas para o desenho dos *primers* (Tabela 2). Para avaliar a especificidade dos candidatos, foi efetuado em paralelo, o alinhamento das sequências de nucleotídeos correspondentes às sequências de aminoácidos alinhados.

Tabela 2- Descrição dos *primers* degenerados utilizados nas clonagens dos respectivos genes candidatos V-ATPase subunidade A (*V-ATPase*), *Receptor de Ecdisona* (*EcR*) e *Arginina Kinase* (*AK*) em *Diatraea saccharalis* e tamanho dos fragmentos amplificados esperados. Os números que precedem os *primers* significam a ordem em que foram usados nas reações de amplificação.

Genes	***Forward***	***Reverse***	**Tamanho Esperado (pb)**
	1- GTRGGNGTYATGGCNCANATHCA	1- TGNTCRAARTCNGCYTTDATYTT	1635
V-ATPase	2- ATGGCNACNATHCARGTNTAYGA	2- TTNACNGGRTCYTTRCCYTTCAT	1590
		3- ACNTGYTTRTARAANGGRCARAA	1431
	1- TGYGTRGGNTGYAARGGNTTYTT	1- ACRTCCCADATYTCYKCNARRAA	1023
EcR	2- TGYGTRATNGAYATGTAYATGMG	2- CARAARTGNARNARRTCYTCDAT	642
		3- GTCATYACNGTDATYTGNCKRAA	399
	1- GGNTTYAARAARACNGAYAARCA	1- CCRTCRTDCATYTCYTTNACNGC	762
AK	2- GARDVNCARTAYAARGARATGGA	2- CCNCCYTCNGCYTCNGTRTGYTC	540
		3- ARRTGRTCYTCYTCRTTRCACCA	261

R = purinas; Y = pirimidinas; M = A/C; K = G/T; H = A/C/T; B = C/G/T; V = A/C/G; D = A/G/T; N = todas as bases.

3.2.2. Extração de RNA de *Diatraea saccharalis*

Para a clonagem dos genes candidatos, amostras de cada instar de *D. saccharalis* foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até a extração de RNA total. Cada amostra foi extraída separadamente a partir de cerca de 100 mg de material, utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Todas as soluções utilizadas para a extração de RNA foram preparadas com água 0,01% dietilpirocarbonato (DEPC) inativa (autoclavada). Para a determinação da concentração do RNA total extraído, uma alíquota de 2 µL foi submetida à leitura em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) e sua integridade foi examinada por eletroforese em gel de 1% agarose desnaturante em tampão 1X SB (10mM NaOH pH 8,5; ajustado com ácido bórico) (BRODY; KERN, 2004) a 3 V cm^{-1}, aplicando-se uma alíquota de 2 µL do RNA total de cada amostra.

3.2.3. Síntese de cDNA

A partir do RNA total extraído, 2 µg foram tratados com DNAse I (Fermentas; Waltham, MA, EUA) para eliminar contaminação com DNA genômico. Para tal, foram misturados tampão de reação, 2 U de DNAse I e 40 U de inibidor de RNAse Ribolock (Fermentas). A mistura foi incubada a 37°C por 30 min em termociclador Veriti (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA), e após este período, foi adicionado 1 µL de EDTA (50 mM) e a solução passou 10 min a 65°C para inativação da enzima. A seguir, a síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit de transcrição Revertaid (Fermentas). Para isso, 1 µg do RNA tratado, 250 µM de cada dNTP e 2 µM de Oligo dT foram submetidos a uma temperatura de 65°C por 5 min e resfriadas em gelo. Logo após, foram adicionados 4 µL de tampão *5X RT Buffer* (Fermentas), 20 U de Ribolock RNAse Inhibitor (Fermentas) e 200 U da enzima *RevertAid Premium Reverse Transcriptase* (Fermentas) em um volume final de 20 µL. A reação foi incubada por 30 min a 50°C e 85°C por 5 min para inativação da enzima. As amostras de cDNA de cada instar foram então diluídas à 10^{-1} e um mix de cDNA foi feito com partes iguais de cada instar para a solução de trabalho.

3.2.4. Amplificação dos genes alvos e inserção em vetor de clonagem

Os genes foram amplificados a partir do mix de cDNA total das lagartas empregando a técnica de *Nested PCR*, na qual o produto da primeira reação é utilizado como molde na segunda reação utilizando-se pares de *primers* internos a região de anelamento dos *primers* da primeira reação (Tabela 2). As reações de amplificação continham cerca de 100 ng de cDNA, 3 mM de $MgCl_2$, 100 µM de cada dNTP, 2 U de *Taq* DNA polimerase *High Fidelity* (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA), em tampão adequado, e 1 µM de cada *primer*, em um volume final de 20 µL. A segunda reação (*nested*) foi realizada sob as mesmas condições, exceto por empregar 1 µL do produto da primeira reação no lugar do cDNA e substituir os *primers* pelos internos à eles. A amplificação foi feita em termociclador Veriti (Applied Biosystems) empregando as seguintes condições: 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 40 s, 45°C por 1 min e 72°C de acordo com o tamanho do produto de amplificação (1 min/Kb), finalizando a 72°C por 10 min. Em seguida, as amplificações foram analisadas por eletroforese em gel de 1% agarose. Os fragmentos de interesse após a segunda reação foram então recortados do gel com o auxílio de uma lâmina estéril e purificados utilizando-se o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) de acordo com as especificações do fabricante. Os

fragmento purificados foram clonados em vetor pGEM-T *Easy* (Promega, Madison, WI, EUA), para sequenciamento e elaboração do RNA dupla fita.

Para a clonagem dos fragmentos, cerca de 150 ng de DNA amplificado, purificado e quantificado em DyNA Quant 200 fluorometer (Hoefer; Holliston, MA, EUA), foram aliquotados em microtubo juntamente com tampão de ligação, 50 ng de vetor pGEM-T *Easy* (Promega; Madison, WI, EUA) e 5 U de T4 DNA ligase e incubados a 4°C por 16 h em reações de 10 µL. Em seguida, 2 µL da reação foi utilizado para a transformação de *E. coli*, eletrocompetente cepa TOP10 via eletroporação pelo MicroPulser Eletroporator Apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB (Meio Luria-Bertani - 10 g L^{-1} Triptona; 5 g L^{-1} Extrato de Levedura; 10 g L^{-1}NaCl). As bactérias foram crescidas em meio LB contendo 100 mg L^{-1} ampicilina, mais 40 µg mL^{-1} X-Gal e 0,1 mM IPTG, para seleção das bactérias transformantes.

As bactérias positivas para a transformação foram inoculadas em meio LB líquido contendo 100 mg L^{-1} de ampicilina e a presença do inserto foi confirmada pela extração do DNA plasmidial por lise alcalina, seguida de análise por digestão com *Eco*RI para liberação do inserto. Cerca de 400 ng de plasmídeo contendo o inserto foram digeridos em reações de 10 µL contendo tampão da enzima e 10 U de *Eco*RI por 4 h a 37°C, e a presença do inserto foi confirmada pela amplificação do fragmento via PCR. Para confirmação de identidade do gene de interesse, os plasmídeos foram sequenciados empregando o kit *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (GE Health Sciences, Champaign, IL, EUA). As reações de sequenciamento continham oligo T7 ou SP6, e foram conduzidas sob as seguintes condições de reação: 30 ciclos de 95°C por 20 s, 50°C por 60 s. Foram sequenciados três clones de cada transformação em aparelho ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

3.3. Caracterização do transcritoma de *Diatraea saccharalis*

3.3.1. Extração de RNA de *Diatraea saccharalis* para sequenciamento massivo

O RNA total de *D. saccharalis* para o sequenciamento massal foi extraído utilizando o reagente TRIzol. Cerca de 10 µg de RNA total de cada fase de desenvolvimento: ovos, 1°, 2°, 3°, 4°, 5° e 6° instar larval foram enviados para a empresa Macrogen, Seul, Coréia do Sul, para sequenciamento em equipamento HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, EUA). Primeiramente, foram conduzidas análises das amostras de RNA total para qualidade e integridade por Bioanalyzer (Agilent Tachnologies). Após aprovadas nestes testes, foram

construídas quatro bibliotecas, sendo uma com amostras de ovos, e as outras unificando 2 instars cada, primeiro e segundo instars; terceiro e quarto instars; e quinto e sexto instars utilizando-se o kit *TruSeq RNASample Prep* (Illumina), e estas foram sequenciadas a partir de cada extremidade (*paired-end read*).

3.3.2. Montagem do transcritoma de referência a partir dos dados de sequenciamento RNA-seq

Devido à indisponibilidade de genoma de referência para analisar os dados de RNA-seq de *D. saccharalis*, foi utilizada a estratégia de montagem *de novo* do transcritoma pelo Dr. Roberto Camargo. Primeiramente, os dados gerados pelo sequenciamento foram analisados utilizando-se o *software CLC Genomics Workbench* (CLC Bio; Aarhus, Dinamarca). Os arquivos FASTQ oriundos do sequenciamento foram limpos (*trimmed*) para a extração das sequências dos adaptadores e para exclusão de sequências com baixa qualidade. A seguir, os quatro arquivos, referente a cada biblioteca, foram submetidos a alinhamento (*de novo assembly*) para geração do transcritoma do inseto. Após a montagem do transcritoma e obtenção da lista de contigs, foi conduzida a anotação dos contigs por análise de ontologia gênica (GO) empregando-se o programa Blast2Go (CONESA et al., 2005).

3.4. Novos genes alvos para silenciamento de *Diatraea saccharalis*

3.4.1. Escolha dos novos alvos

Após a montagem do transcritoma, dois genes da via do hormônio juvenil (JH) e de ecdisteróides foram identificados e escolhidos: o *Juvenile Hormone Epoxide Hydrolases* (*JHEH*), que embora pouco estudado em trabalhos com o objetivo silenciamento gênico, alguns autores o apontam como sendo o gene biologicamente mais relevante no catabolismo do Hormônio Juvenil (LAWRENCE et al., 2005), e o *Neverland*, que se encontra no início da via de síntese do hormônio Ecdisona, responsável pela ecdise da lagarta, e codifica a enzima que converte colesterol em 7-dehidrocolesterol (LAWRENCE et al., 2005).

O gene *Quitina Sintase* (*QS*) foi escolhido por sua função na formação da quitina, principal proteína constituinte do exoesqueleto dos artrópodes. Esta enzima atua no desenvolvimento da cutícula, traquéia, e intestino (TIAN et al., 2009). Desde que a *Quitina Sintase* é encontrada em artrópodes e fungos e não em vertebrados e plantas, acredita-se que

esta enzima seja o alvo regulador de crescimento ideal para atingir o inseto (TIAN et al., 2009).

3.4.2. Clonagem dos novos genes candidatos

Os novos alvos identificados a partir do transcritoma de *D. saccharalis* foram amplificados utilizando-se pares de *primers* específicos (Tabela 3), desenhados empregando o programa Primer3 a partir da sequência dos contigs obtidos na análise do transcritoma. As reações de amplificações continham cerca de 5 ng do mix de cDNA de lagartas de todos os instars, 400 µM de cada dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 µM de cada *primer*, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas) em tampão $(NH_4)_2SO_4$, num volume final de 25 µL. A amplificação foi conduzida nas seguintes condições: 95° por 2 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 40 s, finalizando a 72°C por 2 min. As etapas subsequentes da clonagem, análise em gel, purificação da banda do gel, clonagem em vetor pGEM-T *Easy*, transformação de bactéria e confirmação do inserto, foram realizadas como no item 3.2, com exceção do sequenciamento, feito em sequenciador 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Tabela 3- Descrição dos *primers* para amplificação dos genes *Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase, Neverland* e *Quitina Sintase*. Estão listadas as respectivas identificações, as sequências de nucleotídeos dos *primers* e o tamanho do amplicon gerado em pares de bases (pb)

Genes	Sequência (5'- 3')	Amplicon (pb)
Juvenile hormone epoxide hydrolase (*JHEH*)	F- TGCACCCAAGAAAAGCTACG R- CACCGCTGAATCTGTTAAAGC	448
***Neverland* (*NVD*)**	F: CGCTAAAATACCGCCTCCAT R: CCCCAATGTTTCAGTTCAGG	441
***Quitina Sintase* (*QS*)**	F:ATTTTCGGAAAGTTCGCTTG R: TCTGCGAGATCCTCAGTTTTT	410

3.5. Seleção de método para entrega de dsRNA para o inseto

Primeiramente, foi necessário estabelecer um método eficiente no qual a solução contendo dsRNA seria entregue à lagarta. Alguns ensaios preliminares foram realizados a fim de analisar a viabilidade de cada abordagem antes dos experimentos envolvendo a solução com dsRNA.

Inicialmente, foi testado o depósito de solução na superfície da dieta artificial, e para tal, foram utilizadas placas contendo 24 poços de 3,4 mL de volume com 16 mm de diâmetro. Cem µL de solução de água com 10% corante alimentício (Arcolor Azul) foram depositados sobre 1 mL de dieta solidificada e deixada descansar por 24 h à temperatura ambiente com a placa fechada, de modo que a solução pudesse penetrar na dieta. Posteriormente, em torno de 50 lagartas neonatas foram postas a se alimentar neste ambiente. A placa foi fechada com papel adesivo transparente (Contact) com pequenos furos para aeração e para evitar que as lagartas escapassem. Amostras foram tomadas em triplicatas após 24, 48 e 72 h de exposição ao tratamento.

Em uma segunda abordagem, plântulas enraizadas *in vitro* da variedade 'IAC87-3396', gentilmente cedidas pela Dra. Silvana Creste, pesquisadora do "Centro de Cana" do Instituto Agronômico de Campinas, foram aclimatizadas por duas semanas em caixas de 5 L contendo 1/4 da concentração de sais da solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) até que atingissem aproximadamente 20 cm de altura. Estas plântulas tiveram suas raízes retiradas e foram imersas em 200 µL de solução de água destilada e 10% corante alimentício (Arcolor Azul) para que pudesse ser analisada a capacidade e o tempo de absorção da solução, juntamente com o fluxo da solução no interior da planta. Posteriormente, 10 lagartas neonatas foram postas a se alimentar destas plantas, isoladas por uma gaiola feita a partir de garrafas plásticas PET de 500 mL e "voil" (Figura 2). Após 24 h, 48 h e 96 h, amostras destas lagartas foram tiradas.

O mesmo tipo de ensaio foi conduzido com plantas provenientes de toletes de cana-de-açúcar, onde minitoletes oriundos de plantas da coleção de germoplasma do CENA/USP foram limpos e colocados para germinar em caixas vazadas contendo vermiculita (Terra Mater) úmida, mantidos em câmaras a 32°C com fotoperíodo 14/10h até que atingissem cerca de 30 cm de tamanho. As brotações foram removidas dos minitoletes e 10 lagartas neonatas foram postas para se alimentar destas brotações em gaiolas feitas de garrafas plásticas e "voil". Amostras destas lagartas foram coletadas após 24 h, 48 h e 96 h do início da alimentação.

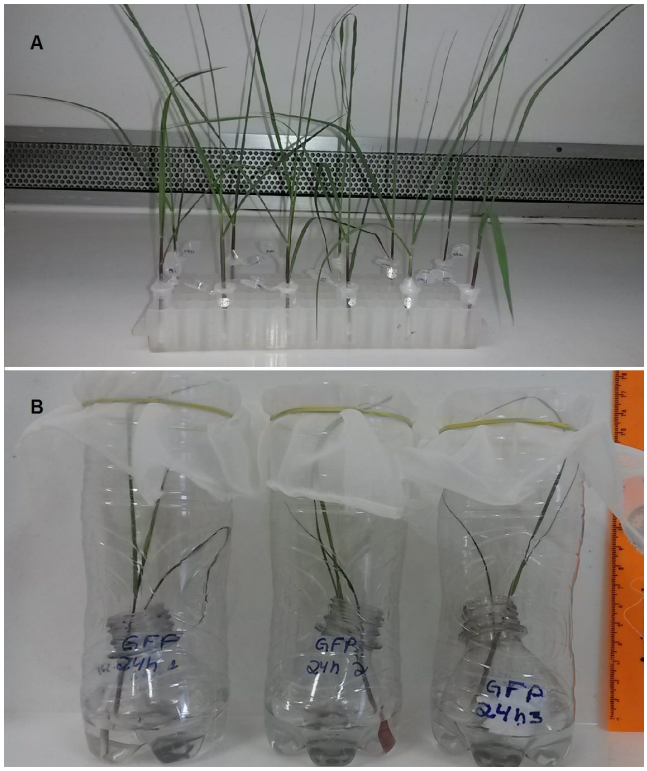

Figura 2- Montagem de ensaio com plântulas de cana-de-açúcar para avaliar a dispersão a capacidade e o tempo de absorção das plântulas e o tempo de permanência das lagartas nestas condições. (A) Plântulas sem raízes em microtubos para a absorção da solução imposta. (B) Gaiolas feitas a partir de garrafas PET de 500 mL prontas para ensaio com lagartas neonatas em plântulas de cana-de-açúcar.

O método de ingestão por gota, usada por Yang et al. (2010) em *D. saccharalis*, também foi testado no presente trabalho, onde uma solução contendo corante alimentício (Arcolor Azul) e 2% sacarose como fagoatrativo, foi servida a lagartas recém mudadas para o 4° instar por meio de micropipeta. Estas lagartas foram previamente submetidas á 16 h sem alimentação de modo a estimular a entrega da solução após o período de jejum (Figura 3). Depois da ingestão da solução, as lagartas foram reintroduzidas em dieta artificial e mantidas em câmara à 26°C ± 2°C e fotoperíodo 14/10h. As amostras de larvas foram retiradas em 24 h, 72 h e 96 h após a imposição do tratamento.

Em uma variação deste método, quatro gotas de 3 µL cada da mesma solução anterior foram aplicadas sobre parafilme (Parafilm M; American National Can, Menasha, WI, EUA) e foram dispostas em placas de Petri plásticas contendo papel-filtro umedecido. Lagartas neonatas (com menos de 24 h da eclosão) foram colocadas em placas de modo que a alimentação esteve disponível por 24 h. As placas foram fechadas com fita adesiva e conservadas em câmara à 26°C, no escuro. Transcorrido o tempo, as lagartas

preferencialmente de coloração azul foram coletadas para análise (Figura 4). A coloração azul na lagarta nos indica que apesar de não ser possível quantificar, a lagarta ingeriu a solução disponível.

Figura 3 - Lagartas de quinto instar de *Diatraea saccharalis* após alimentação por gota com auxilio de pipeta. Solução contendo 2% sacarose e corante alimentício.

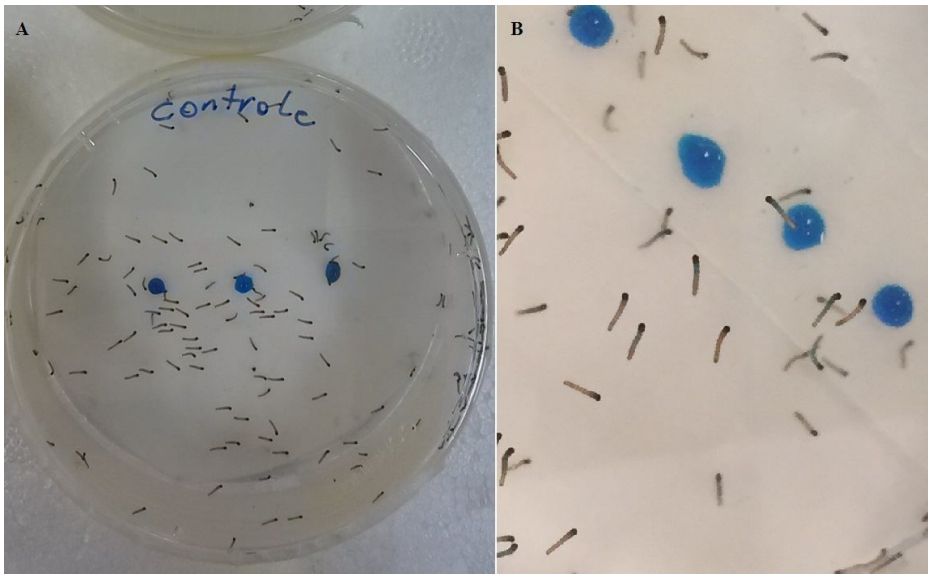

Figura 4 – (A) Esquema de montagem de placa para experimento de oferecimento de gotas para neonatas. Pode-se observar o parafilme suportando as gotas de solução de alimento e aproximadamente 120 lagartas postas para se alimentar na placa; (B) Em aproximação, lagartas neonatas adquirindo coloração azul após o inicio da ingestão da solução disponível.

Os métodos testados para os ensaios com dupla fita abordam dois tipos de entrega de RNA. Quando ele é absorvido pela planta antes de atingir a lagarta, o dsRNA entra na maquinaria de RNAi e é processado em siRNA pela endoribonuclease Dicer da própria

planta. Nos métodos por gota ou depósito em dieta, a lagarta ingere diretamente o dsRNA, que será processado integralmente no interior da lagarta.

3.6. Ensaio de RNAi em *Diatraea saccharalis*

3.6.1. Síntese de dsRNA a partir dos genes clonados

A partir dos clones com os fragmentos de regiões dos sete genes alvos de *D. saccharalis* inseridos no vetor pGEM-T *Easy* , foi realizada a síntese do dsRNA por transcrição *in vitro* com a enzima T7 RNA polimerase (*MegaScript* T7, Ambion, Thermo Fischer), segundo as recomendações do fabricante. O vetor pGEM-T *Easy* contém a região de inserção do gene flanqueado pelos sítios T7 e SP6, e as sequências alvo foram amplificadas utilizando-se *primer* T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG), juntamente com um *primer* em que a sequência SP6 é seguida pela sequência do *primer*T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGGATTTAGGTGACACTATAG). Desta forma, obtêm-se por amplificação as sequências dos genes de interesse flanqueadas por sítios de anelamento da polimerase T7. Esta reação de amplificação para a adição dos sítios T7 às sequências alvo molde foi realizada contendo 25 ng de DNA plasmidial, 2,5 mM de $MgCl_2$, 100 µM de dNTP, 0,1 µM de cada *primer* e 2 U de *Taq* polimerase em tampão de $(NH_4)_2SO_4$ e volume final de 25 µL. As condições do termociclador foram 95°C por 2 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 1 min, com 72°C por 2 mim de extensão final. As reações foram submetidas à eletroforese em gel de 1% agarose em tampão TAE e os fragmentos de interesse extraídos do gel e purificados com o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) de acordo com a orientação do fabricante. A sequência molde foi então quantificada em fluorômetro DyNA Quant 200 e utilizada em reação de transcrição *in vitro* contendo cerca de 500 ng de DNA molde, tampão da enzima, 7,5 mM de cada ribonucleotídeo, 200 U de RNA polimerase *MegaScript T7* em volume de 20 µL. A reação foi incubada a 37°C por cerca de 8 h. A etapa seguinte consistiu da purificação do dsRNA por precipitação com $LiCl_2$ de acordo com a orientação do fabricante. A quantificação do dsRNA foi realizada através do aparelho Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen), no modo ssRNA *High Sensitivity*, seguindo a orientação do fabricante.

Em todos os ensaios de entrega de dsRNA, o controle negativo de dsRNA empregado foi uma região do gene *GFP* (*Green Fluorescent Protein*). Para isso, a sequência do gene *GFP* foi obtida a partir do vetor pCAMBIA 1303 com a sequência amplificada utilizando-se

os *primers* GFP-F (5`TAATACGACTCACTATAGGGCAGTGGAGAGGGTGAA) e GFP-R (5`TAATACGACTCACTATAGGGTTGACGAGGGTGTCTC) contendo segmentos gene-específicos seguidos pela sequência do *primer* T7 *forward* e *reverse* (nucleotídeos sublinhados), amplificando 316 pares de base. As reações de amplificação de *GFP* foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 25 ng de DNA plasmidial, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 µM de dNTP, 0,2 µM de cada *primer* e 1,5 U de *Taq* polimerase (Fermentas) em tampão de $(NH_4)_2SO_4$. As condições de reação foram 95°C por 2 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s, terminando com ciclo a 72°C por 2 mim. Para a transcrição *in vitro* foram utilizadas as mesmas condições descritas para os genes-alvo.

3.6.2. Ensaio de fornecimento de dsRNA a *Diatraea saccharalis*

3.6.2.1. Entrega via gota para lagartas de 4° instar

Para avaliar o efeito do silenciamento gênico para os genes alvo selecionados, foi realizado um ensaio de alimentação por gota, utilizando lagartas que sofreram ecdise do terceiro para o quarto instar e após passarem 16 h em período de jejum, foram alimentadas, uma única vez, com 2,5 µL de solução de dsRNA acrescida com 2% sacarose como fagoatrativo. A concentração de dsRNA fornecida variou de 1 à 3,3 µg por lagarta. Como controle negativo, lagartas de mesmo instar foram alimentadas com dsRNA de *GFP* nas mesmas condições. Após a ingestão da solução, as lagartas foram recolocadas em alimentação artificial em placas devidamente identificadas. Este ensaio foi realizado uma vez com cada gene e com triplicatas biológicas, e as larvas foram coletadas 6 h, 24 h e 72 h após a ingestão do dsRNA, sendo mantidas em câmara a 26°C ± 2°C e fotoperíodo de 14/10h. Após a coleta, as lagartas foram imersas em nitrogênio líquido para a preservação do RNA e armazenadas em ultrafreezer -80°C até o momento de extração de RNA.

3.6.2.2. Dose resposta via gota em neonatas

Para otimizar a concentração de dsRNA utilizado para experimentos de gota em neonatas, experimentos de dose resposta envolvendo 3 concentrações de dsRNA com o gene *V-ATPase* foram realizados. As concentrações foram estipuladas com base no experimento anterior de modo a encontrar a menor concentração com eficiência para o propósito. Deste modo, foram testadas as concentrações de 1,7 µg μL^{-1}, 2,5 µg μL^{-1}, e 3,3 µg μL^{-1} de dsRNA.

Para obter a concentração requerida, as quantidades de dsRNA foram submetidas à secagem por centrifugação a vácuo pelo Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 30°C até completamente seco. Os pellets de dsRNA foram suspensos em solução contendo 2% sacarose e 5% corante alimentício (Arcolor Azul). A integridade das amostras após os tratamentos de secagem foi certificada em gel de 1,2% agarose em tampão 1% SB (10mM NaOH pH 8,5; ajustado com ácido bórico) (BRODY; KERN, 2004).

Aproximadamente 120 lagartas neonatas foram dispostas em placas de Petri plástica contendo 4 gotas de 3 µL cada da solução de dsRNA de *V-ATPase* nas concentrações 1,7, 2,5 ou 3,3 µg μL^{-1} de dsRNA suportadas por Parafilm M em papel filtro umedecido. As placas foram fechadas com fita adesiva e mantidas a 26°C por 24 h no escuro. A amostragem foi feita coletando 3 replicações contendo 30 lagartas cada, preferencialmente azuis, para cada extração de RNA e análise. Estes ensaios foram conduzidos em triplicatas independentes com dois controles negativos, o gene *GFP* nas mesmas concentrações que *V-ATPase*, e também com a solução sem conter o RNA dupla fita.

3.6.2.3. Via gota para neonatas com todos os genes

Depois de estabelecida a concentração de resposta, ensaios nas mesmas condições do anterior (3.6.2.2.) foram realizados para os seis genes alvos selecionados. Da mesma forma, o experimento foi repetido três vezes de forma independente, e amostras foram tiradas em triplicata.

3.6.3. Extração de RNA e síntese de cDNA de *Diatraea saccharalis* para análise de expressão gênica

RNA total das lagartas de *D. saccharalis* utilizadas em ensaio de alimentação foi extraído utilizando o reagente TRIzol e quantificado em NanoDrop. O tratamento com DNAse I e síntese de cDNA foram realizados como descritos nos itens 3.2.2. e 3.2.3.

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

As reações de amplificação foram realizadas com 5 ng de cDNA, 5 µL de *SYBR Green Platinum* (Invitrogen), 0,2 µM de cada *primer* (Tabela 4) num volume final de 10 µL de reação. O perfil de reação foi estabelecido com duas temperaturas iniciais: 50°C por 10 min e

95°C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de três passos: 95°C por 15 s, 60°C por 25 s e 72°C por 30 s realizadas no RotorGene-6000 (Qiagen; Hilden, Alemanha). Após a amplificação, determinou-se a curva de dissociação (*melting curve*) entre 72°C e 95°C. As análises de RT-qPCR dos genes alvo para o silenciamento nos experimento foram realizadas em duplicata técnica com controle negativo, sem cDNA. Todos os *primers* foram testados para eficiência de reação (*E*) por meio de curva padrão obtida com os valores de expressão de quatro diluições (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}) de um mix de cDNA proveniente dos 6 instars larvais. Foram utilizadas como controle negativo lagartas que receberam o dsRNA referente ao gene *GFP* para os ensaios com lagartas de 4° instar, e lagartas que receberam a solução branco para os ensaios com neonatas. Como genes de referência (normalizador endógeno) foram desenhados e testados *primers* para os genes proteína ribossomal S19*(RPS19*), proteína ribossomal S10 (*RPS10*) e dois conjuntos de *primers* para Actina 1 (Tabela 4).

A estabilidade da expressão de cada gene referência foi calculada pelo *software NormFinder* (versão 0.953) (http://moma.dk/normfinder-software). Este programa calcula a variação da expressão intra e inter grupos, onde os grupos são definidos como as diferentes condições do experimento. Determinando assim, o gene referência mais estável em um conjunto de genes testados, calculando os valores de estabilidade para os candidatos organizando em escala decrescente os mais estáveis (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004).

Para isso, o *NormFinder* necessita que os valores de C_{Qs} sejam transformados em quantidades relativas (Q). Pela formula Delta C_Q, a amostra com maior nível de expressão, ou seja, menor C_Q, recebe o valor 1 e os demais valores são subtraídos desta (VANDERSOMPELE et al., 2002).

$$Q = E^{(\text{Delta Cq})}$$
$$Q = E^{(\text{Cq min-Cq amostra})}$$

Q= quantidade relativa;
E= eficiência da amplificação (2 = 100%);
Cq min = menor valor de C_Q = C_Q da amostra com maior expressão.

Para as análises de expressão gênica, em todos os experimentos, os valores de C_Q (*cycle quantification*) foram utilizados para determinar a diferença do número de transcritos de acordo com o método "Delta Delta" (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001): razão = $2^{-\Delta(\Delta Cq)}$, sendo $\Delta C_Q = C_{Q(\text{gene alvo})} - C_{Q(\text{gene referência})}$ e o $\Delta = \Delta C_{Q(\text{tratamento})} - \Delta C_{Q(\text{controle})}$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Teste Tukey, com 5% de significância.

Tabela 4- Descrição dos *primers* para análise de expressão dos genes alvos de silenciamento e de referência. Estão listadas as respectivas siglas, as sequências de nucleotídeos dos *primers*, o tamanho do amplicon em pares de bases (pb), o valor da eficiência do *primer* e do coeficiente de determinação.

Genes	**Sequência (5'- 3')**	**Amplicon (pb)**	**E**	**R^2**
***V-ATPase* subunidade A**	F- CGAGCGAGGTAACGAGATGT R- ACTGGCATGTTGGAGGTGTT	126	1,87	0,998
Receptor de Ecdisona (*EcR*)	F:TACAACGCAACACAATCGCT R: CTTCTCGCCCTGATGACATT	145	1,99	0,995
***Arginina Kinase* (*AK*)**	F: AAGACAACATACGCCTCAGC R: TCCTTCGGCTCAACACTCT	133	1,93	0,994
Juvenile hormoneepoxide hydrolase (*JHEH*)	F: TGATACCATTGGTGTGGCTTT R: CCACCATGTGGAGTGTTGAG	111	1,84	0,990
***Neverland* (*NVD*)**	F:GAAGACGCTCCTGAACTGAAAC R:CCCAATGTGGATAGTAAAGATGG	146	1,75	0,998
***Quitina Sintase* (*QS*)**	F: TCCGACCACCGAAGAAATAC R: TGTGACGAATCTTTGCCTTG	111	2,02	0,992
RPS19	F- AAAACTCTATGGGGTCTTCTCG R- TGGTGACTTGTATGAATGATTGG	102	1,98	0,992
RPS10	F- TGATCGCTTCAGTGTTGCTG R- TCTCAAATCCAGGGGTTACG	139	1,99	0,997
***Actina 1* (1)**	F- AGCCTTCCTTCTTGGGTATG R- GCGTACAAGTCCTTACGGATG	97	1,94	0,996
***Actina 1* (2)**	F- CCATCGGTAAAGAGAGGTTCC R- CGCAAGATTCCATACCCAAG	72	1,98	0,999

R^2: Coeficiente de determinação; E: Eficiência de amplificação.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Genes alvos iniciais para o silenciamento de *Diatraea saccharalis*: escolha e clonagem

Inicialmente, foram escolhidos como alvo para silenciamento os genes codificantes da subunidade A da ATPase vacuolar (*V-ATPase*), da enzima *Arginina Kinase* (*AK*) e do Receptor de Ecdisona (*EcR*). A bomba H^+ATPase do tipo vacuolar é uma das enzimas mais fundamentais da natureza, estando presente em quase todas as células eucariotas e é responsável por gerar gradientes de energia numa grande variedade de organelas e membranas (NELSON et al., 2000). A subunidade A de seu domínio é o setor catalítico da proteína responsável pela hidrólise do ATP, e com isso espera-se que a supressão deste gene seja fatal para o inseto (THAKUR, 2014). Já a enzima Arginina Kinase (*AK*) pertence à família de proteínas chamadas transferases, que catalisam a transferência de grupos fosforil de alta energia de uma molécula de ATP para uma molécula de L-arginina, formando fosfoarginina, que é usada como um acumulador de energia (BRAGG et al., 2012).

A seleção destes genes como alvos para este estudo foi devido a resultados obtidos acerca de RNAi previamente descritos para diversas ordens e espécies de insetos, porém pouco relatados para Lepidoptera. Em coleópteros, larvas de *D. v. virgifera*, quando alimentadas com dsRNA de *V-ATPase-A*, apresentaram maior mortalidade, enquanto que plantas de milho transgênicas expressando versões em grampo (*hairpin*) de regiões desse gene como dsRNA apresentaram redução de dano sofrido pelo ataque da praga ao sistema radicular (BAUM et al., 2007). Da mesma forma, dsRNA de *V-ATPase-A* também induziu a mortalidade de larvas dos coleótperos *D. undecimpunctata howardii* e *Leptinotarsa decemlineata* (BAUM et al., 2007). Em Hemiptera, o silenciamento de *V-ATpase-A* por meio de alimentação de *Bemisia tabaci* com dieta artificial, foi o mais eficiente entre cinco outros genes testados, levando a maior mortalidade, de até 97,5% (UPADHYAY et al., 2011). Plantas transgênicas de tabaco expressando uma versão em grampo (*hairpin*) de *V-ATPase-A* causaram de 34 a 83% de mortalidade de *B. tabaci*, com redução de 62% dos transcritos do gene alvo após 8 dias de alimentação (THAKURet al., 2014).

O silenciamento do gene *Arginina Kinase* de invertebrados por ingestão foi efetivo em afetar o desenvolvimento larval do coleóptero *Phyllotreta striolata*, aumentando a mortalidade e reduzindo a fertilidade e fecundidade (ZHAO et al., 2008). Resultados do nosso grupo com a Lepidoptera *T. absoluta* indicaram que o fornecimento de dsRNA de *V-ATPase*

A e *AK* para larvas levaram a cerca de 40% de redução no acúmulo de transcrito de ambos os genes em comparação ao controle, com uma mortalidade de cerca de 50% para o tratamento com *V-ATPase*e entre 40-60% para *AK* (CAMARGO, 2014).

Os receptores de Ecdisona (*EcR*) pertencem a superfamília de proteínas de receptores de hormônios esteróides, importante família de reguladores da transcrição envolvidos em diversos processos fisiológicos como controle do desenvolvimento embrionário, diferenciação celular e homeostase (SCHWABE; TEICHMANN, 2004). Em *Drosophila*, o hormônio esteróide ecdisona desencadeia a metamorfose de larvas para adultos, e em resposta a este hormônio, o receptor emite sinais regulando a expressão de diversos genes (KOELLE et al., 1991). O gene *EcR* foi selecionado como candidato alvo de silenciamento baseado em seu papel decisivo durante o processo de ecdise em *Drosophila*, onde larvas nocauteadas para *EcR* cessam o desenvolvimento durante os três primeiros estágios larvais (LI; BENDER, 2000). Lagartas de *H. armigera* postas a se alimentar de plantas de tabaco transgênicas expressando dsRNA do gene *EcR* apresentaram redução de até 82% no número de transcritos deste genes após 48 h (ZHU et al., 2012).

Devido à ausência da disponibilidade destas sequências gênicas para *D. saccharalis*, *primers* degenerados foram desenhados para os três genes (Tabela 2), baseados em genes ortólogos obtidas de outros insetos de forma a permitir a amplificação e clonagem dos homólogos de *D. saccharalis*. De cada amplificação proveniente de *Nested* PCR foram obtidos de 1 a 4 fragmentos, mas com predominância em intensidade de uma banda para cada um dos genes alvos. Baseando em estimativa visual, o fragmento do gene *V-ATPase* apresentou tamanho de aproximadamente 600 pares de base (pb); *AK* de aproximadamente 550 pb, e *EcR* com cerca de 450 pb. Os fragmento foram purificados, clonados em vetor pGEM-T *Easy* e submetidos à digestão com *Eco*RI para a confirmação do inserto (Figura 5). Dois a três clones positivos de cada gene foram sequenciados.

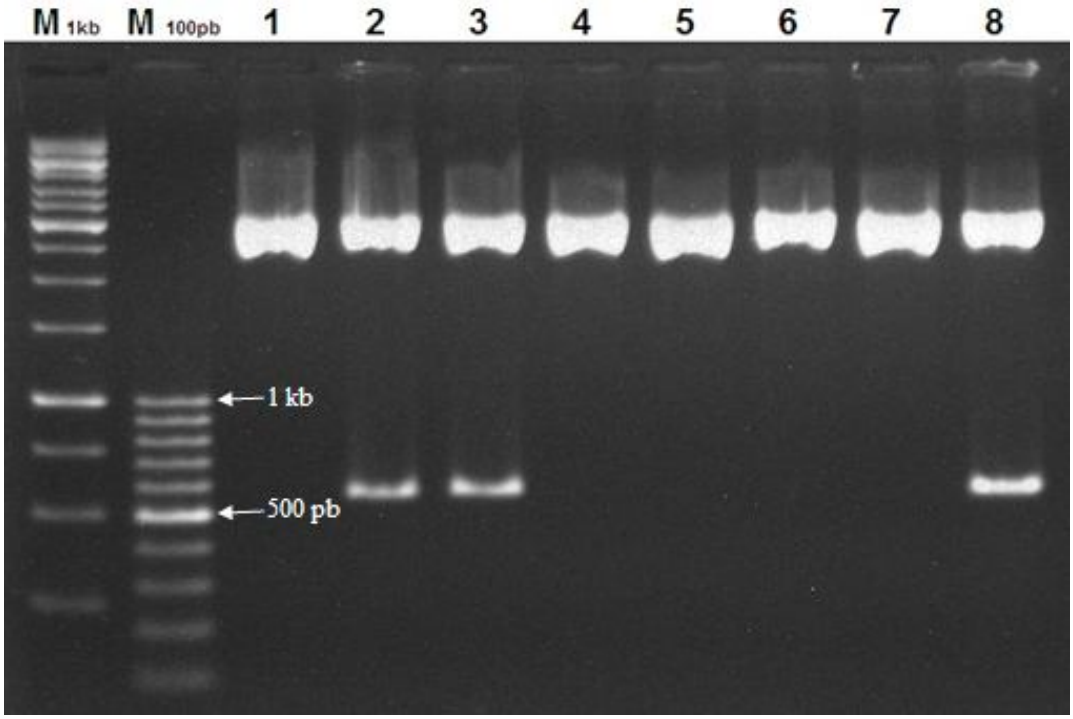

Figura 5- Digestão de plasmídeos pGEM-T *Easy* recombinantes para o gene *Arginina Kinase* pela enzima *Eco*RI. Nas duas primeiras canaletas, marcadores moleculares de 1 kb e 100 pb (Fermentas) respectivamente, canaletas de 1 a 8, amostras de plasmídeos provenientes de colônias de *E. coli*, sendo as amostras 2, 3 e 8, apresentando fragmento positivo, com aproximadamente 550 pb.

Com o resultado do sequenciamento, obteve-se que o fragmento clonado do gene *V-ATPase* apresentava o tamanho de 636 pb, transcrevendo uma proteína total de 212 aminoácidos (Figura 6). Para o gene *EcR*, foram obtidos insertos de 468 pb, transcrevendo uma proteína com 154 aminoácidos. O gene *AK* apresentou um tamanho de 539 pb e sua proteína transcrita 173 aminoácidos. As sequências foram traduzidas e alinhadas com sequências ortólogas de outras espécies de insetos, como *B. mori, M. sexta, Plutella xylostella, Spodoptera frugiperda, Omphisa anastomosalis, Danaus plexippus, Papillio ulysses, H. armigera*, utilizando o programa MultiAlign (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/) para confirmação de identidade (Figura 6).

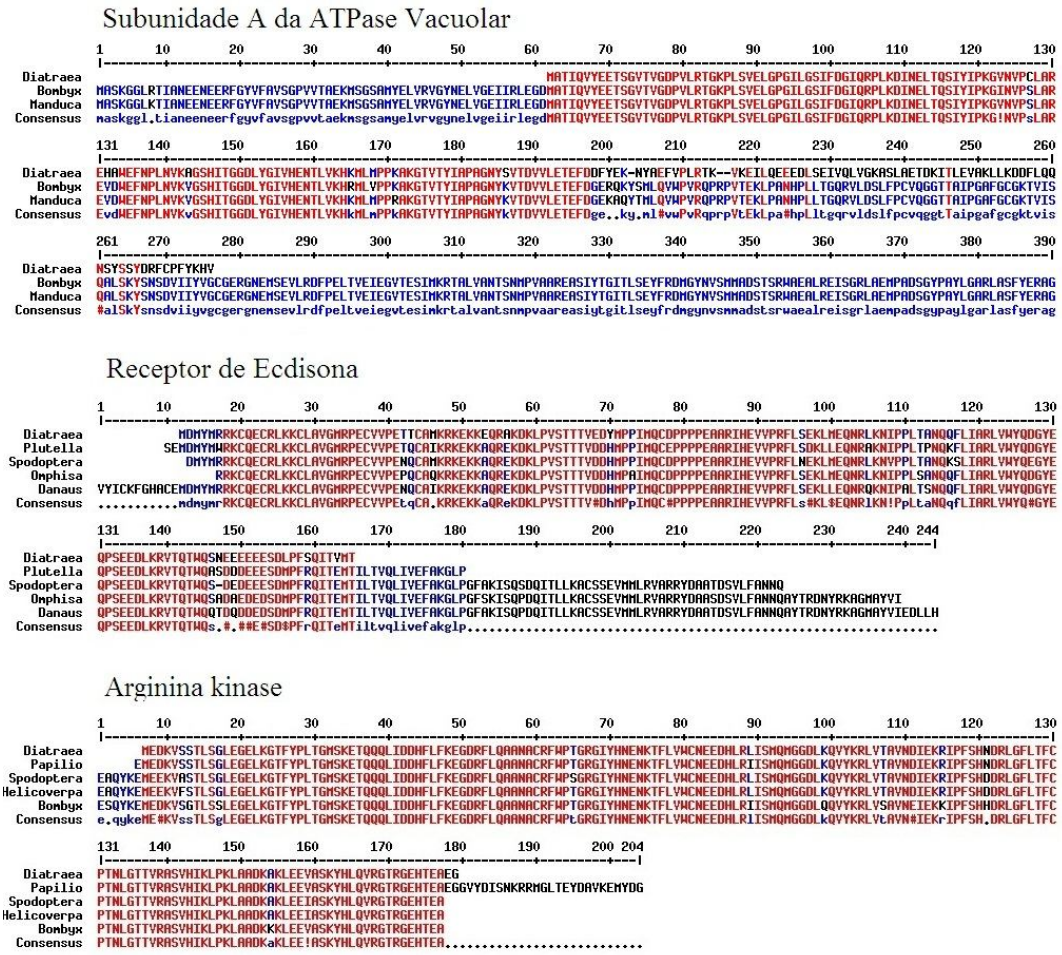

Figura 6 - Alinhamento das sequências de aminoácidos sequenciados dos fragmentos gênicos clonados em pGEM-T *Easy* dos genes *V-ATPase A*, *Receptor de Ecdisona* (*EcR*) e *Arginina Kinase* (*AK*) de *Diatraea saccharalis* com sequências protéicas de outras espécies de insetos para confirmação de identidade.

Pode-se observar na Figura 6 que o fragmento sequenciado do gene *V-ATPase* apresenta disparidade no final de sua sequência. Ao realizar um Blastp nesta sequência, nota-se que o fragmento parece ser composto de dois fragmentos distintos do mesmo gene. Ao comparar estes fragmentos com a sequência protéica de *Bombyx*, observa-se que os fragmentos possivelmente constituem uma molécula quimérica (Figura 7). Isto pode ter acontecido no momento do anelamento dos *primers* degenerados à sequência de cDNA. Embora este ocorrido não seja ideal, optou-se por dar continuidade no trabalho pelo fato de serem partes do mesmo gene alvo e os resultados não seriam comprometidos, pois o dsRNA deste fragmento será processado em siRNAs pela lagarta.

```
                    1       10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110       120       130
                    |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
Diatraea_1 parte                                                                                   MATIQVYEETSGVTVGDPVLRTGKPLSVELGPGILGSIFDGIQRPLKDINELTQSIYIPKGVNVPCLAR
     Bombyx_mori    MASKGGLRTIANEENEERFGYVFAVSGPVVTAEKMSGSAMYELVRVGYNELVGEIIRLEGDMATIQVYEETSGVTVGDPVLRTGKPLSVELGPGILGSIFDGIQRPLKDINELTQSIYIPKGINVPSLAR
Diatraea_2 parte
       Consensus    .........................................................matiqvyeetsgvtvgdpvlrtgkplsvelgpgilgsifdgiqrplkdineltqsiyipkg.nvp.lar

                    131     140       150       160       170       180       190       200       210       220       230       240       250       260
                    |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
Diatraea_1 parte    EHAWEFNPLNVKAGSHITGGDLYGIVHENTLVKHKMLMPPKAKGTVTYIAPAGNYSVTDVVLETEFD
     Bombyx_mori    EVDWEFNPLNVKVGSHITGGDLYGIVHENTLVKHRMLVPPKAKGTVTYIAPAGNYKVTDVVLETEFDGERQKYSMLQVWPVRQPRPVTEKLPANHPLLTGQRVLDSLFPCVQGGTTAIPGAFGCGKTVIS
Diatraea_2 parte
       Consensus    e..wefnplnvk.gshitggdlygivhentlvkh.ml.ppkakgtvtyiapagny.vtdvvletefd.........................................................

                    261     270       280       290       300       310       320       330       340       350       360       370       380       390
                    |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
Diatraea_1 parte
     Bombyx_mori    QALSKYSNSDVIIYVGCGERGNEMSEVLRDFPELTVEIEGVTESIMKRTALVANTSNMPVAAREASIYTGITLSEYFRDMGYNVSMMADSTSRWAEALREISGRLAEMPADSGYPAYLGARLASFYERAG
Diatraea_2 parte
       Consensus    ......................................................................................................................

                    391     400       410       420       430       440       450       460       470       480       490       500       510       520
                    |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
Diatraea_1 parte
     Bombyx_mori    RVKCLGNPDREGSVSIVGAVSPPGGDFSDPVTAATLGIVQVFWGLDKKLAQRKHFPSINWLISYSKYMRALDDFYEKNYPEFVPLRTKVKEILQEEEDLSEIVQLVGKASLAETDKITLEVAKLLKDDFL
Diatraea_2 parte                                                                                   DFYEKNYAEFVPLRTKVKEILQEEEDLSEIVQLVGKASLAETDKITLEVAKLLKDDFL
       Consensus    ..............................................................dfyekny.efvplrtkvkeilqeeedlseivqlvgkaslaetdkitlevakllkddfl

                    521     530       540       550       560       570       580       590       600       610     617
                    |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+-------|
Diatraea_1 parte
     Bombyx_mori    QQNSYSSYDRFCPFYKTVGMLKNIITFYDMSRHAVESTAQSDNKVTWNVIRDAHGHVLYQLSSMKFKDPVKDGEPKIKADFDQLLEDMSAAFRNLED
Diatraea_2 parte    QQNSYSSYDRFCPFYKHV
       Consensus    qqnsyssydrfcpfyk.v...................................................................
```

Figura 7 - Alinhamento do fragmento resultante do sequenciamento do gene *V-ATPase sub A* de *Diatraea saccharalis* traduzido e dividido em dois fragmentos com a proteína completa do mesmo gene em *Bombyx mori*.

As sequências protéicas resultantes da clonagem foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do NCBI de *B. mori* pelo Blastx. Desta forma, a sequência presumível de proteína dos dois fragmentos do gene *V-ATPase* apresentou identidade de 91 e 83% para os respectivos fragmentos, e similaridade de 94 e 87%, respectivamente. Para a proteína presumível de EcR, esta identidade foi de 81% e 89% de similaridade. O fragmento clonado de *AK* apresentou 95% de identidade de aminoácidos com *B. mori* e uma similaridade de 98%.

4.2. Caracterização do transcritoma de *Diatraea saccharalis*

Apesar de terem sequenciadas quatro bibliotecas de *D. saccharalis* durante este trabalho, foram utilizadas apenas a versão unificada destes dados, numa montagem global *de novo* do transcritoma, que foi usado como referência. As análises realizadas empregando o *CLC Genomics Workbench* (*de novo assembly*) permitiram a formação de um total de cerca de 126 mil contigs, com o maior contig medindo 6497 pb, o menor 201 pb, e uma média de 464 pb (Tabela 5). Este número de contigs é superior ao que seria esperado de um total de genes predito para esta espécie, comparando com outros insetos que tiveram seu genoma sequenciado, como *B. mori*, também da ordem Lepidoptera, que possui 18.501 genes (XIA et al., 2004), ou *D. melanogaster* (Diptera), que possui 13.379 genes (ADAMS et al., 2000) ou *T. castaneum* (Coleoptera), que possui 16.404 genes (RICHARDS et al., 2008). Isso pode ter ocorrido devido à montagem do transcritoma completo ter sido realizada por meio de *reads*,

ou seja, sem um genoma de referência, resultando em significante desafio computacional (HASS, ZODY et al., 2010). Além disso, o *software* CLC não foi desenhado especificamente para a tarefa de montagem sem um genoma de referência, como outros *softwares* disponíveis, tais como *Trinity* (GRABHEER et al., 2011) e *Oases* (SCHULTZ et al., 2012). Apesar disso, com o alinhamento realizado e anotação realizados, pode-se chegar a contigs que representam potenciais genes alvos para *D. saccharalis*.

Tabela 5- Sumário de dados do transcritoma da broca da cana-de-açúcar.

Número total de contigs	126.039
Número de contigs > 1 kb	8.219 (6,5%)
Tamanho médio de contigs (pb)	464
Tamanho total dos contigs (pb)	58.467.446
Contig mais longo (pb)	6.497
Contig mais curto (pb)	201
Porcentagem de GC (%)	36,82%

Após a montagem do transcritoma e a obtenção da lista de contigs, foi feita uma análise de ontologia gênica com o software Blast2GO através de buscas realizadas pelo Blastx contra o banco de proteínas não redundantes do NCBI. Os resultados desta análise indicam que dos 126.039 contigs montados, por volta de 18,3 mil contigs (14,5%) apresentaram ontologia gênica (GO), aproximadamente 12,5 mil contigs apresentaram *hits* positivos de BLAST (10%). Enquanto que 6,5 mil (5,15%) tiveram suas sequências associadas à via metabólica através do *Kyoto Encyclopedia of Genes Genomes* (KEGG), Cerca de 63 mil contigs não apresentaram similaridade (BLAST *hits*) ou não apresentaram nenhum resultado com alguma sequência disponível nas bases de dados consultadas durante o processo de anotação.

As análises mostraram ainda que insetos foram os organismos predominantes como origem nas buscas por similaridade (Figura 8), sendo as espécies *B. mori* e *D. plexippus*, ambos da ordem Lepidoptera, apresentando maior similaridade com o transcritoma gerado. Este resultado mostra que a montagem realizada, apesar de apresentar um elevado número de contigs e baixo número de anotação por Blast2GO, possui um sentido biológico, pois além de apresentarem muitos contigs similares com sequências descritas, os insetos são os organismos predominantes nesta semelhança.

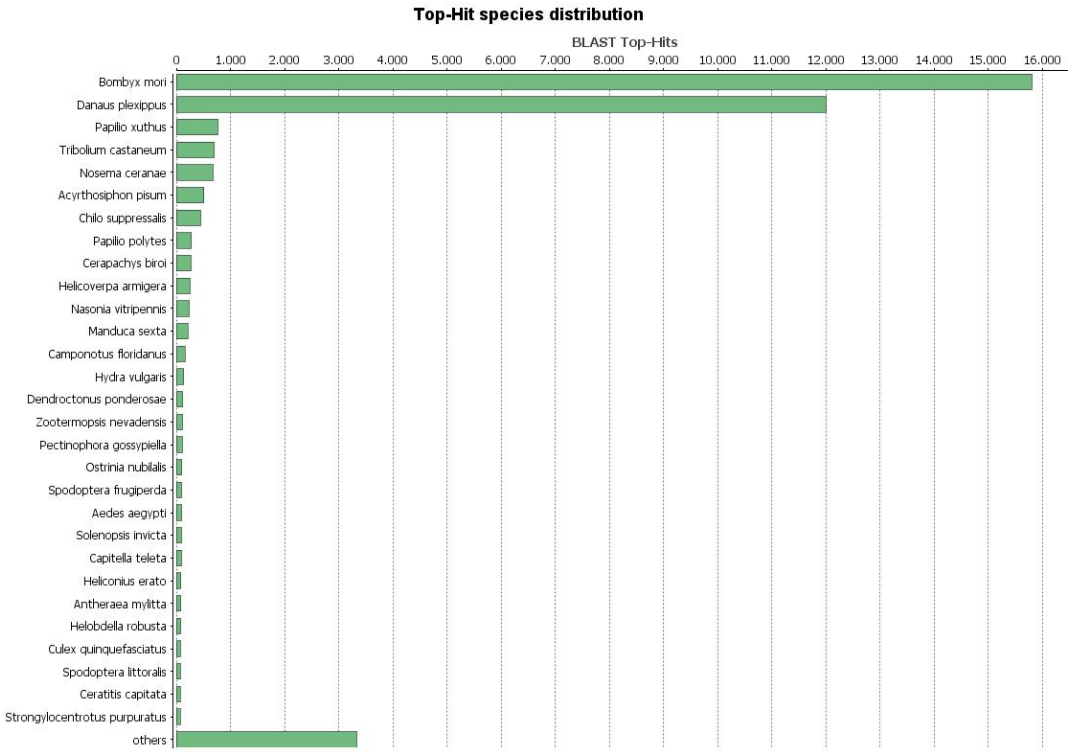

Figura 8 – Principais espécies representadas entre os contigs *Diatraea saccharalis* que apresentaram similaridade a sequencias conhecidas por Blast2Go. O maior número de alinhamentos de genes do inseto se deu com *Bombyx mori* e *Danaus plexippus*.

A anotação do transcritoma da *D. saccharalis* pelo Blast2GO revelou as principais categorias de ontologia gênica (GO) entre “Processos Biológicos”, “Função Molecular” e “Componente Celular” (Figura 9). Dentre estes, o maior número de contigs na categoria de ‘Processos Biológicos’ estão classificados como processo celular com 8.990 contigs (26,8%) e processo metabólico apresentando 8.460 contigs (25,3%). Já em ‘Função Molecular’, ligação e atividade catalítica se destacam com 9.873 e 8.680 contigs (43,5% e 38,2%), respectivamente. Em ‘Componente Celular’, a categoria célula apresenta o maior número de sequências identificadas, 4.616 contigs (33,3%), seguida por membrana, com 3.341 contigs (24,1%). Estes resultados corroboram aqueles obtidos por Camargo et al. (2015), ao analisarem o transcritoma da traça do tomateiro *T. absoluta*, a fim de buscar genes alvos para o uso da técnica de interferência por RNA na praga. Com o mesmo intuito, ao analisar o transcritoma da lagarta do cartucho *S. exígua*, outro lepidóptero, também foi verificado resultados similares (LI et al., 2013).

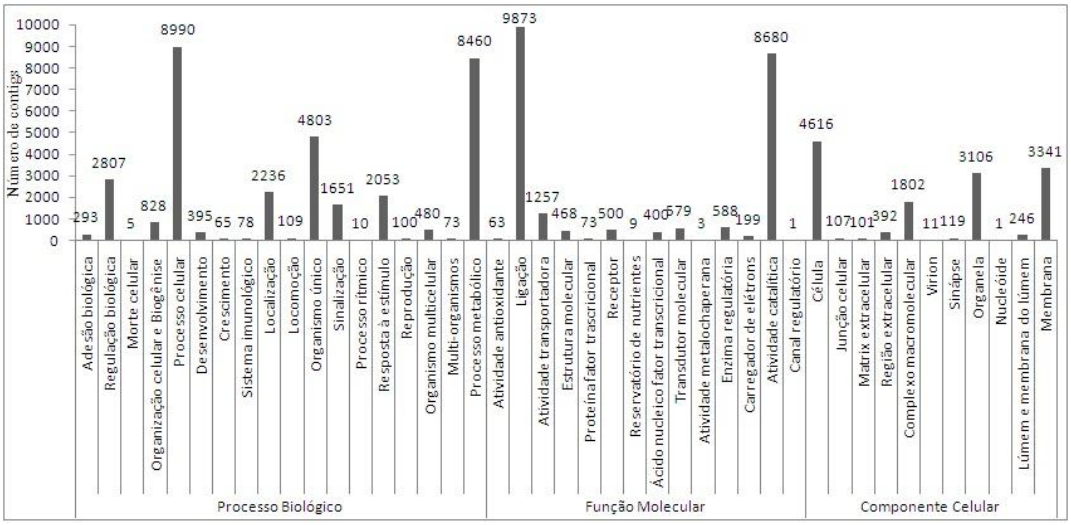

Figura 9 – Classificação da ontologia gênica (GO) do transcritoma de *Diatraea saccharalis*. A análise dos 126.039 contigs foi conduzida por Blast2Go utilizando Blastx para recuperar anotações com homologia significativa do NCBI. Todos os termos “Processos Biológicos”, “Função Molecular" e "Componente Celular” no nível 2 são representados como número total de sequências.

Os dados do transcritoma *D. saccharalis* foi consultado para o conjunto básico de genes da maquinaria de RNAi usando genes homólogos de *B. mori*, *D. melanogaster* e *C. elegans*. Os principais passos funcionais de siRNA e do processamento de microRNA investigados para homólogos, incluiram a absorção de dsRNA por *Sid*-1 e *Sid*-2, clivagem de dsRNA em siRNA por *Dicer*, montagem do *RNA-induced silencing complex* (complexo RISC), incluindo helicases presumíveis (*Armitage*, *SpindleE*, *Rm62*) e de ligação do dsRNA (*R2D2* e *loquacius*), alvo de degradação pela atividade endonuclease (família Argonauta, *Aubergine*) e amplificação do sinal por RNA polimerase dependente de RNA (*RdRP*). A lista dos genes associados ao mecanismo básico de siRNA e microRNA encontrados no transcritoma de *D. saccharalis* com respectivos números de contigs com similaridade a um E-value<e^{-20} são apresentados na Tabela 6.

Nesta análise, foramidentificados contigs homólogos para S*id*-1 (7 contigs), *Sid*-2 (3 contigs) e *Sid*-3 (2 contigs), que juntos representaram 12 contigs distintos. Também foram buscados ortólogos dos três genes de *C. elegans* (*rsd*-2, *rsd*-3, e *rsd*-6) envolvidos na linha germinal relacionados com RNAi de resposta sistêmica (MIYATA et al., 2014), mas não foi identificado nenhum homólogo no transcritoma de *D. saccharalis*. Dois contigs de homólogos foram encontrados para *Dcr*-1, cinco para *Dcr*-2, e dois para *Drosha*. A busca por fatores de ligação dsRNA revelou homólogos presumíveis para *loquacius* (2 contigs), *R2D2* (1 contigs)

e *Pasha* (1 contig), enquanto na busca por homólogos de endonucleases, foram identificados *Argonauta*-1 (6 contigs), *Argonauta*-2 (4 contigs), *Argonauta*-3 (4 contigs), *Piwi* (5 contigs) e *Aubergine* (3 contigs). Não houve contigs com semelhança significativa para RNA polimerase dependente de RNA (*RdRP*). A ausência de RdRP em insetos prevê que quaisquer efeitos silenciamento gênico produzido por RNAi através da alimentação de insetos seja limitado e requerem a entrada contínua de dsRNA para que possa persistir (PRICE, GATEHOUSE, 2008).

Tabela 6 – Genes envolvidos no mecanismo de RNAi encontrados no transcritoma de *Diatraea saccharalis*, a que família eles pertencem (função) e o número de contigs encontrados.

Função	**Gene**	**Número de Contigs (Transcritos)**
Absorção de dsRNA	*Sid-1*	7
	Sid-2	3
	Sid-3	2
Corte de dsRNA	*Dicer-1*	2
	Dicer-2	5
	Drosha	2
Ligação de dsRNA	*Loquacious*	2
	R2D2	1
	Pasha	1
Atividade Endonuclease	*Ago1*	6
	Ago2	4
	Ago3	4
	Alg-2	2
	Rde-1	1
	Ergo-1	1
	Piwi	5
	Aub	3
	Aubergine	3
	Armitage	2
	Asp (Spindle E)	1
	Spindle E	1
	Rm62	12
Outros	*Tudor*	1
	Mut-7	2

Baseado nos contigs encontrados, o mecanismo de RNAi em *D. saccharalis* apresenta semelhança com os de outros insetos, como *T. absoluta* (CAMARGO et al., 2015), *Anthonomus grandis* (FIRMINO et al., 2013) e *T. castaneum* (RICHARDS et al., 2008), nos quesitos de clivagem, ligação e atividades Argonautas, mas difere de dípteros, cujas proteínas responsáveis pela captação do dsRNA não foram encontradas (KENNERDELL, CARTHEW, 2000). Nenhum gene envolvido na degradação do dsRNA foi encontrado (como por exemplo: *Snp*, *Eri-1* e *Pint-1*).

Os três genes previamente selecionados também foram buscados no transcritoma montado e comparados com sequências de *B. mori* depositadas em banco de dados. A identificação do contig relativo ao gene *V-ATPase sub A* se dá pelo código 'comp62097', este contig, que apresenta 1.299 pares de bases e codificando uma proteína de 406 aminoácidos, enquanto para o mesmo gene em *B. mori* apresenta 2.265 pb e sua proteína contem 617 aminoácidos. O gene *EcR* é identificado pelo contig 'comp45486' que possui 1.320 pb e codifica uma proteína de 319 aminoácidos, em *B.mori* a proteína possui 603 aminoácidos e seu gene completo, 2.702 pb. Para o gene *AK*, o contig identificado foi o 'comp63218', com 1.022 pb e codificando 267 pb, ela também é menor que seu representante em *B. mori*, que possui 1.495 pb e 385 aminoácidos codificados. A identificação destes transcritos nos dados gerados demonstra a qualidade da montagem do transcritoma, porém, nenhum destes contigs apresentou a sequência completa dos genes.

4.3. Novos genes alvos para o silenciamento de *Diatraea saccharalis*: escolha e clonagem

Com base nas análises do transcritoma da *D. saccharalis*, foram selecionados três novos genes alvos para o silenciamento por RNAi: o gene *Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase* (*JHEH*) e *Neverland* (*NVD*), que fazem parte da via de síntese e catabolismo dos hormônios juvenil e ecdisônio, respectivamente e a *Quitina Sintase* (*QS*), que é um importante componente do revestimento do exoesqueleto dos insetos.

A degradação do Hormônio Juvenil (JH) ocorre principalmente através da ação de esterases dohormônio juvenil (JHE) e/ou do hormônio juvenil epóxido hidrolase (JHEH), ambas as quais conduzem a um decréscimo na sinalização (KLODEN, 2007). Esta degradação ocorre na hemolinfa do inseto, e pode acontecer em momentos precisos em seu ciclo de vida (XIA et al., 2013).

No caso de ecdisteróides, desde que artrópodes não possuem a enzima esqualeno-sintase, a síntese de ecdisteróides depende de uma fonte exógena de colesterol derivado da

dieta, o que requer desalquilação e uma série de passos de hidroxilação do colesterol (KLODEN, 2007), catalisada por enzimas citocromo P450 codificadas pelos genes *Halloween* (*phantom, disembodied, shadow* e *shade*) (DE LOOF, 2008). O gene *Neverland* (*NVD*) atua no início da via de síntese do ecdisônio ou 20-hidroxiecdisônio, convertendo o colesterol em 7-dehidrogenase, o qual é precursor dos genes *Halloweens* os quais mediam a biossíntese do ecdisônio. É expresso na glândula protorácica, podendo indicar que este gene tem um papel fundamental na biossíntese do Ecdônio, já que esta glândula é responsável por sua produção (XIA et al., 2013).

As Quitinas Sintases são proteínas de membranas que catalizam a síntese de quitina por meio de ligações covalentes entre monômeros de N-acetilglucosamina (GlcNAc). A quitina é o maior componente do exoesqueleto e membranas peritróficas dos insetos e, portanto com papel importante durante o desenvolvimento do inseto (CHEN et al., 2008; FIRMINO et al., 2013). A seleção do gene *QS* para este estudo se baseou em resultados prévios acerca de RNAi. O gene *QS* foi silenciado em fêmeas adultas (pré-cópula) de *Anthonomus grandis* (bicudo do algodoeiro) por microinjeção, e foi possível observar que os ovos provenientes destas fêmeas apresentavam baixo índice de eclosão e aqueles que conseguiam eclodir, não se desenvolviam (FIRMINO et al, 2013). Este trabalho expõe um mecanismo desconhecido de amplificação de sinal de RNAi diferente do de nematóides e plantas, já que o gene *RdRP* não foi encontrado em genomas de insetos. O uso de RNAi visando silenciar o gene *QS* também gerou deformidades fenotípicas por injeção de larvas de 4º instar de *S. exígua*, (CHEN et al., 2008) ou por expressão de dsRNA em bactérias *E. coli* transformadas que foram ingeridas por larvas (TIAN et al.,2009).

A amplificação desses três genes candidatos foi realizada a partir do mix de cDNA, que inclui amostras de todos os instars e ovos da broca da cana com os *primers* específicos (Tabela 3), desenhados com base nas sequências dos contigs obtidos no transcritoma. O gene *JHEH*, identificado no transcritoma por 'comp70679' com 583 pb, codificando uma proteína de 148 aminoácidos, *NVD*, 'comp19977', possuindo 580 pb, codificando 63 aminoácidos e o gene *QS*, 'comp25359', com 1.437 pb, codificando uma proteína de 475 aminoácidos. A identidade destes genes foi confirmada pelo alinhamento dos contigs com sequências referentes aos genes de outros organismos encontrados no banco de dados do NCBI (Figura 10). Estas sequências, obtidas pelo transcritoma da *D. saccharalis*, foram comparadas com as sequências dos genes relativos de *B. mori* depositadas em banco de dados. O gene *JHEH* possui 2.796 pb e 460 aminoácidos, para o *NVD*, são 1.679 pb, codificando uma proteína de

453 aminoácidos em *B. mori*. Já *QS* apresenta 4.869 pb e codifica 1.563 aminoácidos. Assim como nos genes iniciais, os contigs encontrados no transcritoma não apresentam o gene completo, o que pode ser reflexo da montagem a partir de *reads*, sem base em um genoma modelo. A clonagem foi confirmada pelo sequenciamento dos fragmentos e alinhamento com os transcritos referentes aos gene.

Ao se trabalhar com organismos que possuem poucas sequências disponíveis em bancos de dados, há duas opções, ambas abordadas neste trabalho. O método de escolha de genes pela literatura e pelo desenho de *primers* degenerados, com base em genes ortólogos depositadas no banco de dados, é relativamente simples, porém, não há garantias de que o gene selecionado será funcional para o inseto em questão. A montagem do transcritoma do inseto demanda tempo e é laboriosa, porém, por ser uma tecnologia aberta, tem-se liberdade na busca de novos genes alvos. A anotação destes genes possibilita o foco em determinada função ou via que se quer estudar.

Neste trabalho, utilizamos três genes da via biossintética ou de catabolismo hormonal dos insetos, o *receptor de Ecdisona*, o *JHEH* e o *Neverland*, sendo que os dois últimos, até então, não foram relatados em trabalhos de RNAi; porém, observando a função que cada um deles exerce no metabolismo hormonal, eles foram selecionados acreditando-se que seu silenciamento geraria um comprometimento no desenvolvimento da *D. saccharalis*. Pela montagem do transcritoma, podem-se analisar os genes diferentemente expressos nos diversos estágios de desenvolvimento, sendo esta outra abordagem para a busca de genes alvos para o silenciamento, buscando genes com maior ou menor expressão especificamente no estágio que induz o maior dano, por exemplo.

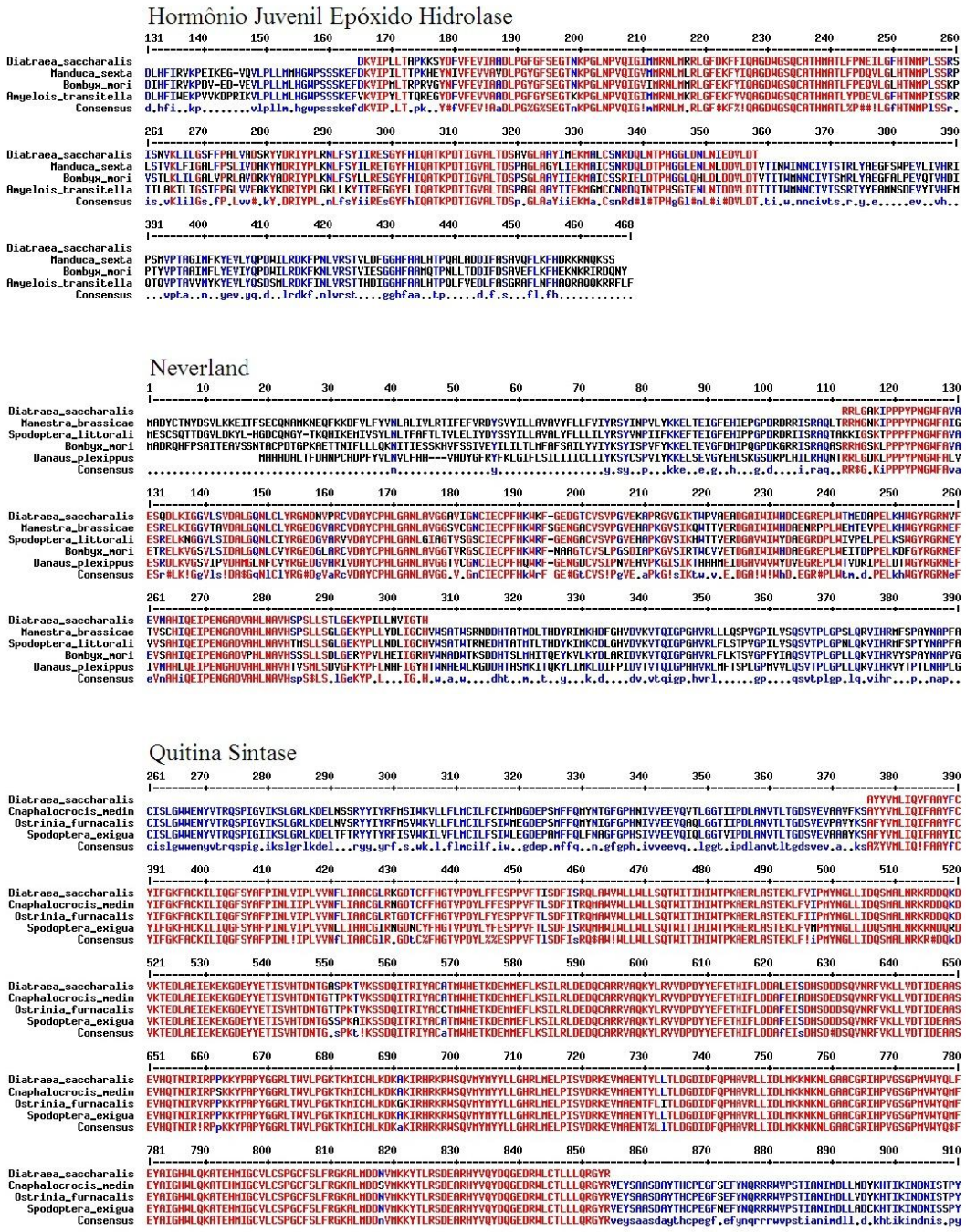

Figura 10 – Alinhamento das sequências de aminoácidos provenientes do transcritoma de *Diatraea saccharalis* dos genes *JHEH*, *Neverland* e *Quitina Sintase* com sequências protéicas de outras espécies de insetos para confirmação de identidade.

4.4.Avaliação de métodos de entrega do dsRNA para o inseto

A adição de dsRNA nas dietas artificiais oferecidos a larvas dos insetos é o método de escolha para entrega, utilizado na avaliação de genes alvo (FIRMINO et al., 2013; MEISTER; TUSCHI, 2004). Devido a disponibilidade de dieta artificial para *D. saccharalis*, optou-se por testar a entrega de dsRNA por meio de incorporação da solução na dieta. Como essa abordagem oferece alguns desafios devido a composição e temperatura da dieta, que poderiam vir a afetar a estabilidade do dsRNA, optou-se pelo depósito da solução sob a dieta solidificada. Logo, neste primeiro ensaio, foi avaliada a abordagem de deposição da solução contendo apenas corante na superfície da dieta artificial. Essa forma de entrega havia sido empregada para avaliar as quantidades de, 10, 20, 40, 60 e 80 µg de dsRNA dos genes quimotripsina, que é uma enzima digestiva, ou de JHAMT, que participa da via biossintética do hormônio juvenil de *H. armigera* em 650 µL de dieta artificial (ASOKAN et al., 2013). Larvas de *D. v. virgifera* tiveram os genes *ebony* e *laccase 2* silenciados fornecidos pro incorporação na dieta, apresentando diferenças fenotípicas por serem importantes genes envolvidos na pigmentação de cutícula, em *D. v. virgifera* (MIYATA et al., 2014).

Notou-se que o poder de penetração da solução de água com 10% corante alimentício (Arcolor Azul) foi baixo, penetrando apenas por cerca de 2-3 mm sem dissipação posterior. Pelo hábito alimentar, diferentemente da *H. armigera* e da *D. v. virgifera*que se mantêm na superfície, quando posta a se alimentar em dieta artificial, a lagarta da *D. saccharalis* tende a penetrar na dieta beirando a parede do tubo e dirigindo-se ao fundo formando uma galeria. Dessa forma, esse hábito da larva tende a desviar da porção da dieta contendo a solução de interesse. Diante dessa observação, não haveria como se certificar que cada lagarta ingeriu de dieta com dsRNA, dificultando o uso desta abordagem.

Para os ensaios com plântulas de cana-de-açúcar e brotações em minitoletes, a intenção foi adaptar a metodologia usada por Camargo (2014) e Luan et al. (2013), que, destacando folíolos de tomateiro e os colocando para absorver uma solução aquosa contendo dsRNA, pode-se constatar silenciamento de genes dos insetos. Foi verificado que a distribuição da solução pela planta ocorreu uniformemente. Como a lagarta se alimenta apenas do colmo, parte considerável do dsRNA absorvido não seria aproveitado, pois as folhas não são consumidas. Esta técnica demandaria uma quantidade bastante significativa de dsRNA para sua execução, e como o rendimento da reação de transcrição *in vitro* não atinge grandes proporções, a montagem de um experimento completo apresentou-se inviável. Para a realização de ensaios consumindo grandes quantidades de dsRNA, a opção seria a transformar

bactérias para que estas expressem e acumulem o dupla fita, como vem sendo feito em diversos trabalhos da área (TIAN et al., 2009; ZHU et al., 2011; YANG ; HAN, 2014ab).

Estas metodologias de prévia absorção de dsRNA pela planta também foram questionadas sobre a forma de entrega do RNA à lagarta, pois poderia haver o processamento do dRNA pela planta, que poderia gerar produtos distintos do processamento pela lagarta. Estudo comparando plantas de tabaco transformadas de dois modos (nuclear e plastidial) para expressar dsRNA do gene codificador da actina do escaravelho da batata, *Leptinotarsa decemlineata*, mostraram que o próprio sistema para a produção de siRNAs evita a acumulação de quantidades elevadas de dsRNA (ZHANG et al., 2015). No trabalho em questão, foi realizada tanto transformação no núcleo da planta quanto no cloroplasto, um compartimento celular que não apresenta maquinaria de RNAi, e deste modo, o dsRNA sintetizado pela planta é acumulado e permanece "encapsulado" nos plastídios, até ser ingerido pela lagarta. Quando expressado pelo genoma nuclear, o dsRNA é processado em siRNA pela eficiente ação das endoribonucleases Dicer própria da planta, gerando monômeros distintos daqueles gerados pela lagarta (ZHANG et al., 2015). Esse fator pode ser responsável pela menor eficiência na proteção completa das plantas contra pragas de insetos. Estes resultados também ressaltam a importância de produzir grandes quantidades de dsRNAs longos para alcançar uma defesa eficiente (ZHANG et al., 2015).

Estudos anteriores de alimentação com dsRNA indicaram que dsRNA longos ingeridos foram mais eficazes para o início da resposta de RNAi do que os siRNAs (dsRNA sintetizados pelo genoma nuclear e processados pela Dicer em siRNA) ingeridos por insetos (WHYARD, 2015). Preferencialmente, dsRNA longos são absorvidos seletivamente pelas as células do intestino por larvas do besouroda raiz do milho, mas o mecanismo de absorção e a sua curiosaseletividade para a longo dsRNA ao invés de curto (siRNA), não foram identificados (WYNANT et al., 2014).

Foi testada então a entrega por microgotas (2,5 μL) para lagartas de quarto instar, de modo que a solução era imposta a lagarta, sabendo-se assim, a quantidade de dsRNA que o indivíduo havia ingerido. Esta abordagem já foi utilizada em *D. saccharalis* (Figura 11) para investigar a função de uma aminopeptidase N na resistência a toxina Bt em larvas de quinto instar (YANG et al., 2010) e, para silenciar o gene codificador do citocromo P450 em *Plutella xylostella* (BAUTISTA et al., 2009). Para estes trabalhos, o método foi eficiente para validar o silenciamento dos genes alvos em poucos dias.

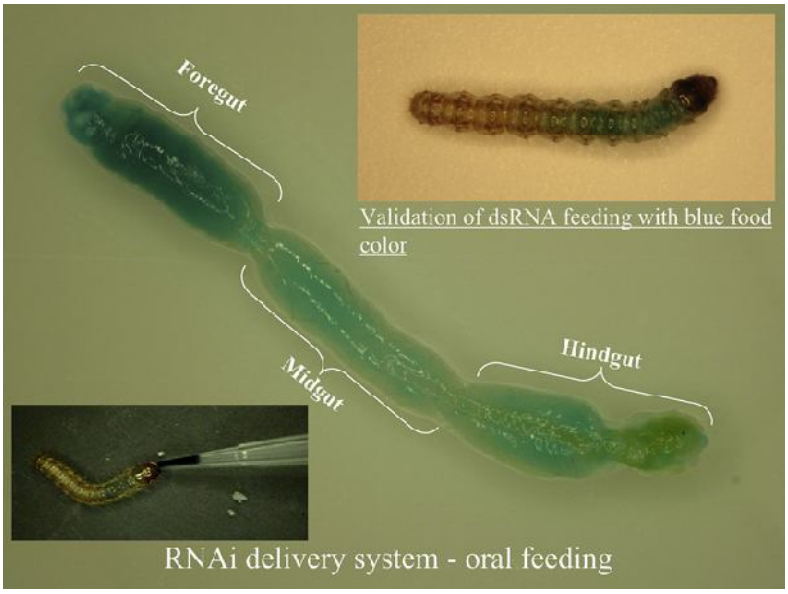

Figura 11 – Alimentação por gota em *Diatraea saccharalis*. Acima: exemplo de lagarta de terceiro instar 3 horas após ser alimentada com solução dsRNA com corante alimentício azul. O intestino superior com coloração evidente através da cutícula. Centro: O intestino larval dissecado. Em destaque, as divisões do intestino: superior (á esquerda), médio (ao centro), posterior (à direita). Abaixo: figura representando o sistema de alimentação oral através de micropipeta (Yang et al., 2010).

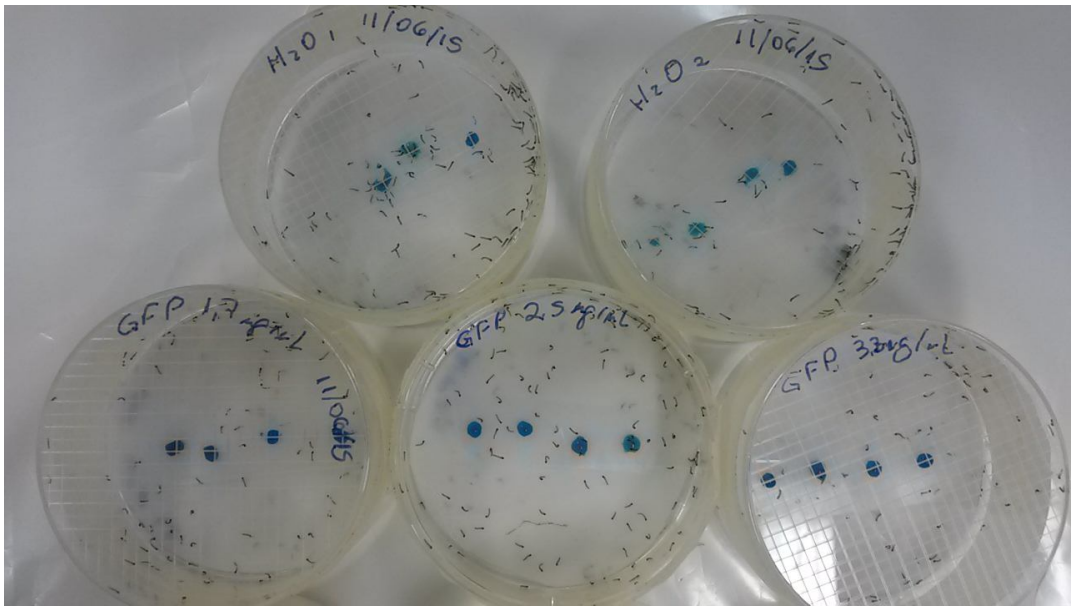

Figura 12 – Esquema de montagem de experimento por gota com lagartas neonatas. Na foto, exemplo de disponibilidade de alimento para as lagartas por 24 horas. Placas superiores: solução controle branco; placas inferiores: solução controle com dsRNA do gene *GFP*.

Também foram conduzidos testes com o fornecimento em gotas de solução fornecidas a disposição de lagartas neonatas para se alimentarem por 24 h. Mesmo não havendo como quantificar o volume e por consequência a massa de dsRNA que foi ingerida, o fato das lagartas apresentarem coloração azul nos indica que houve a ingestão da solução disponível. A disponibilidade do alimento também é um indicativo de que a lagarta pode se alimentar a vontade (Figura 12). Experimento similar foi realizado com *H. armigera*, onde lagartas neonatas foram alimentadas com solução contendo 1 µg μL^{-1} de dsRNA para o gene *EcR* e corante azul, assim que a coloração era visualizada nas lagartas, elas eram retiradas do tratamento, individualizadas e criadas normalmente em dieta artificial (YANG; HAN, 2014a). Porém, a aplicação única do dsRNA em neonatas não foi suficiente para observar alterações fenotípicas no desenvolvimento da fase larval da *H. armigera* (YANG; HAN, 2014a).

4.5. Ensaios de RNAi em *Diatraea Saccharalis*

Para a síntese do dsRNA, as sequências de dos genes alvos *V-ATPase*, *EcR*, *AK*, e também para o controle negativo *GFP* moldes clonadas em pGEM-T foram amplificadas flanqueadas por sítios T7 (Figura 13). Deve-se considerar que, além da sequência dos genes alvos, os fragmentos amplificados possuem 180 pb a mais provenientes do vetor de clonagem (região até o local de anelamento dos *primers* T7 e SP6) e dos próprios *primers* que incluem sequencias T7, apresentando assim, fragmentos a *V-ATPase* com 816 pb, *EcR* com 652 pb, *AK* com 359 pb. O fragmento do gene *GFP* com 276 pb esperados possui apenas 40 nucleotídeos a mais derivado da extensão T7 de seus *primers*, apresentando assim, uma banda de peso molecular de 316 pb. Os outros genes clonados apresentaram fragmentos de 628 pb para *JHEH*, 591 pb para *NVD* e 590 pb para *QS* (dados não mostrados).

Os fragmentos amplificados foram purificados e utilizados para a síntese de dsRNA *in vitro*. O rendimento de dsRNA transcrito *in vitro* variou entre experimentos e genes, mas foi possível obter de 12 a 40 µg por reação.

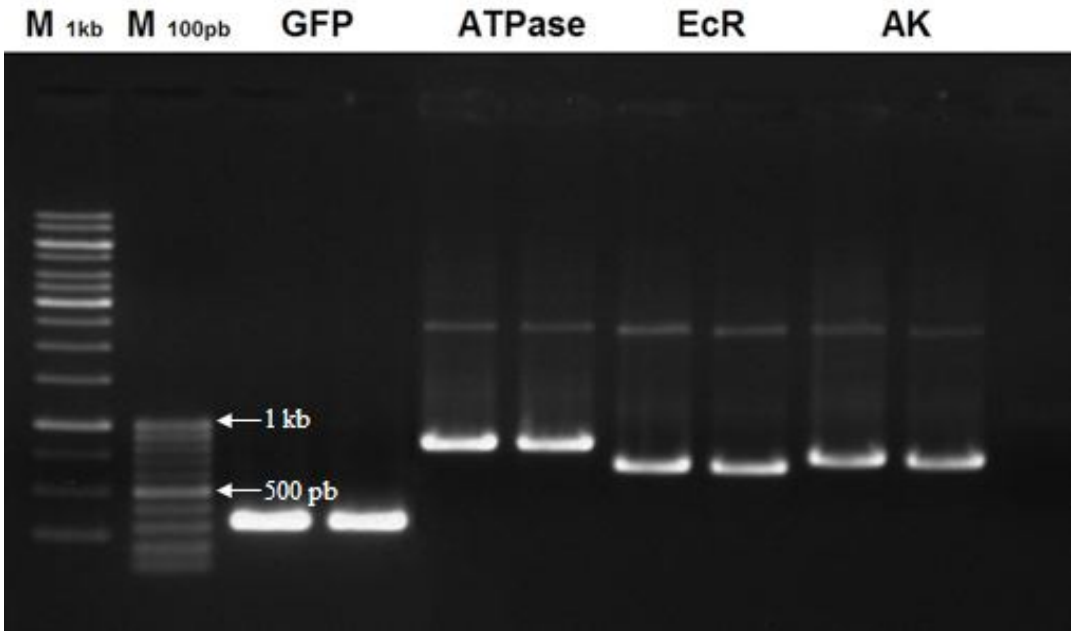

Figura 13 – Produto da amplificação dos genes clonados em plasmídeos para a transcrição *in vitro*de dsRNA. Nas duas primeiras canaletas, marcadores moleculares de 1 kb e 100 pb (Fermentas), respectivamente, seguido de duas amostras do gene controle *GFP*, duas de cada gene alvo: *V-ATPase*, *EcR* e *AK* em ordem.

Para as análises de expressão gênica, o gene referência foi estabelecido empregando-se o *software NormFinder*, que calculou o valor de estabilidade dentre os possíveis genes testados. O gene com o melhor valor de estabilidade foi o da proteína ribossomal S19 (*RPS19*) com 0,12, seguidos pelo gene codificador da Actina 1 com 0,23 para o conjunto de *primers* 2 e 0,27 para o *primer* 1. O gene menos estável foi o da proteína ribossomal S10 (*RPS10*), que apresentou valor de estabilidade de 0,67 (Tabela 7). Com base nos resultados obtidos, o gene de referência da proteína ribossomal S19 (*RPS19*) foi escolhido para realizar as análises de expressão gênica deste trabalho.

Tabela 7 – Valores de estabilidade para os diversos genes referência analisados em amostras de *Diatraea saccharalis* obtido pelo programa *NormFinder*.

Sigla	**Valor de estabilidade**
RPS19	0,119
Actina1 (2)	0,227
Actina1 (1)	0,270
RPS10	0,675

4.5.1.Entrega de dsRNA via gota para lagartas de 4° instar

O ensaio de alimentação por gota com lagartas de quarto instar foi realizado apenas uma vez para cada gene alvo. Esse experimento teve como objetivo validar os genes selecionados de modo a demonstrar a ocorrência de silenciamento por RNAi após a ingestão de dsRNA para genes que não são especificamente expressos no sistema digestivo da larva. Previamente, a ocorrência de silenciamento gênico em *D. saccharalis* havia sido demonstrada apenas para genes que codificam proteinases digestivas (YANG et al., 2010). Diversas tentativas conduzidas não demonstravam a redução na expressão gênicas de genes alvo em *D. saccharalis*, o que sugeririam que essa espécie seria muito recalcitrante ao RNAi.

Para avaliar o efeito do silenciamento gênico dos genes alvo selecionados, foi fornecida uma única vez 2,5 µL de solução de dsRNA acrescida com 2% sacarose contendo de 1 a 3,3 µg de dsRNA por lagartas recém mudadas para o quarto instar, após passarem 16 h sem dieta artificial. Após a ingestão da solução, as lagartas foram individualizadas em placas contendo dieta artificial, onde permaneceram em câmara à 26° C e amostradas a 6 h, 24 h e 72 h após a ingestão do dsRNA (Figura 14).

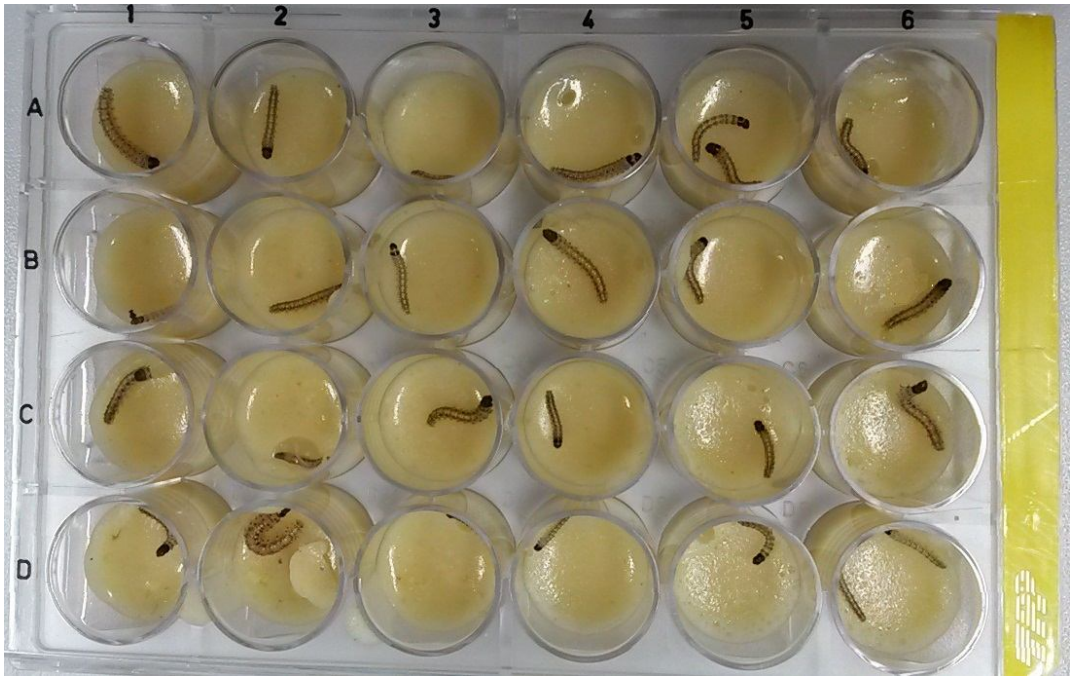

Figura 14–Visão da reintrodução das lagartas em dieta artificial após imposição do tratamento. Na foto, lagartas de 3° e 4° instar individualizadas em placa contendo 1 mL de dieta artificial por poço, após alimentação por gota com solução de 2% sacarose e dsRNA.

No tratamento com a região do gene da subunidade A da *ATPase Vacuolar*, as lagartas receberam o equivalente a 3,3 µg de dsRNA, já que o rendimento da transcrição *in vitro* havia sido o suficiente. Os dados das análises da expressão relativa por RT-qPCR do gene alvo demonstram que houve uma redução de aproximadamente 76% da expressão do gene em relação ao controle (*GFP*) 6 h após o tratamento (Figura 15). Em 24 h, a expressão havia reduzido 53% e se manteve nesse nível em 72 h. Os valores em porcentagem descritos são referentes à média das amostras. Podemos observar que as amostras controle (lagartas alimentadas com dsRNA para o gene *GFP*) apresentaram erro padrão muito elevado, o que limita a conclusão sobre a significância de redução na expressão do gene alvo. Porém, as médias de redução de expressão sugerem uma inibição em relação ao controle. A alta variação pode ser resultado do fato deste experimento ter sido realizado sem repetições, apenas com triplicas biológicas, e com apenas três indivíduos para cada tratamento.

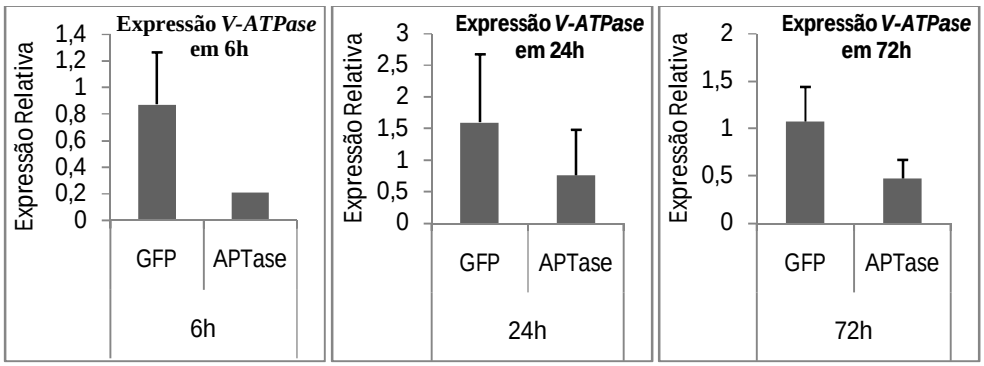

Figura 15 – Expressão relativa em lagartas do 4º instar após tratamento (*V-ATPase*) e controle (*GFP*) com gota contendo 3,3 µg de dsRNA por indivíduo. O nível de expressão foi quantificado por RT-qPCR com o erro padrão mostrado pela barra de erro (*n*=3) e utilizando *RP S19* como gene referência em três momentos 6 h, 24 h e 72 h após tratamento.

No ensaio de RNAi do gene codificador do receptor de Ecdisona *(EcR)*, cada lagarta recebeu 2,6 µg de dsRNA e as análises de expressão relativas mostraram que em 6 h e 72 h, houve uma redução de 18% e 26% na média da expressão relativa, respectivamente, enquanto que as amostras do tratamento em 24 h mostraram um aumento de 79% na expressão deste gene (Figura 16).

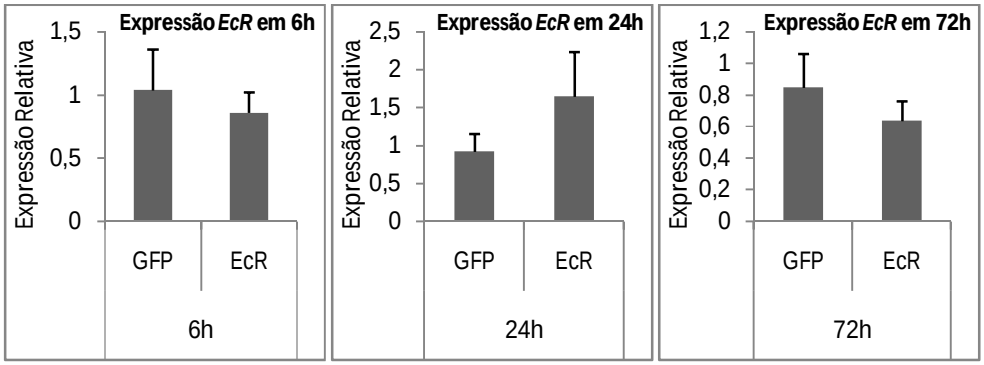

Figura 16 – Expressão relativa em lagartas do 4º instar após tratamento (*EcR*) e controle (*GFP*) com gota contendo 2,6 µg de dsRNA por indivíduo. O nível de expressão foi quantificado por RT-qPCR com o erro padrão mostrado pela barra de erro (*n*=3) e utilizando *RPS19* como gene referência em três momentos, 6 h, 24 h e 72 h após tratamento.

Para o gene *Arginina Kinase* foi testado 1,3 µg de dsRNA por lagarta, e houve uma redução na média de expressão de 61% em 6 h, sendo que em 24 h e 72 h, houve redução no acúmulo de transcritos em 8% e 25%, respectivamente (Figura 17).

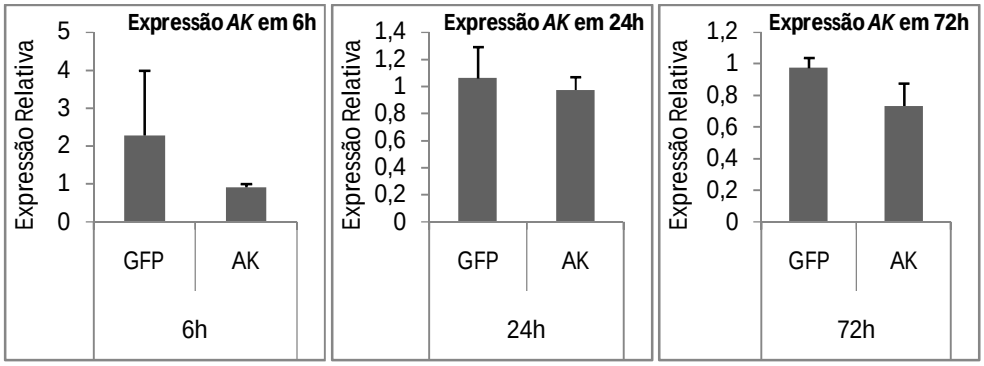

Figura 17 – Expressão relativa em lagarta de quarto instar após tratamento (*AK*) e controle (*GFP*) com gota contendo 1,3 µg de dsRNA por indivíduo. O nível de expressão foi quantificado por RT-qPCR com o erro padrão mostrado pela barra de erro (*n*=3) e utilizando *RPS19* como gene referência em três momentos, 6 h, 24 h e 72 h após tratamento.

No tratamento com o gene *Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase*, foi fornecido 1 µg de dsRNA por lagarta (Figura 18). A expressão relativa média de *JHEH* em relação ao controle diminuiu 38% em 6 h, mas em 24 h houve um maior acúmulo de transcritos (11%) em relação ao controle, e com 72 h o gene alvo apresentou mais que o dobro da expressão do controle.

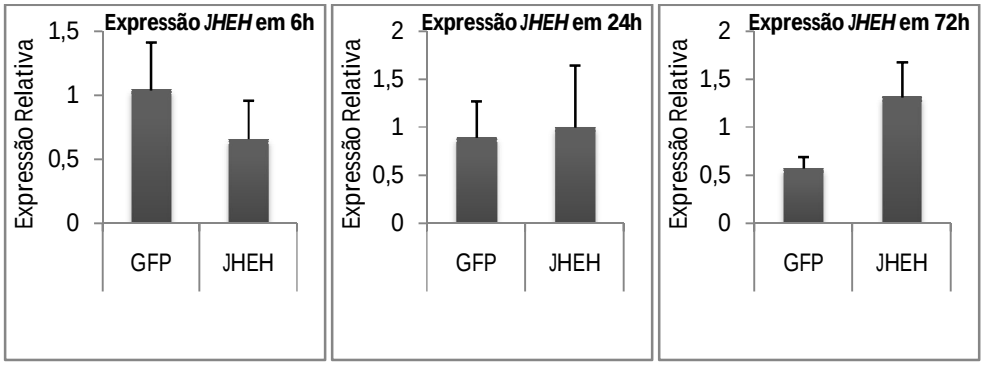

Figura 18 – Expressão relativa em lagartas do 4º instar após tratamento (*JHEH*) e controle (*GFP*) com gota contendo 3,3 µg de dsRNA por indivíduo. O nível de expressão foi quantificado por RT-qPCR com o erro padrão mostrado pela barra de erro (*n*=3) e utilizando *RPS19* como gene referência em três momentos, 6 h, 24 h e 72 h após tratamento.

Nos ensaios para o gene *Neverland*, cada lagarta recebeu o equivalente a 1,5 µg de dsRNA e a redução dos transcritos pôde apenas ser observada em 6 h após tratamento, que reduziu 57% em relação ao controle *GFP*. Para 24 h e 72 h, houve o aumento no acúmulo de transcritos de 125% e 186%, respectivamente (Figura 19).

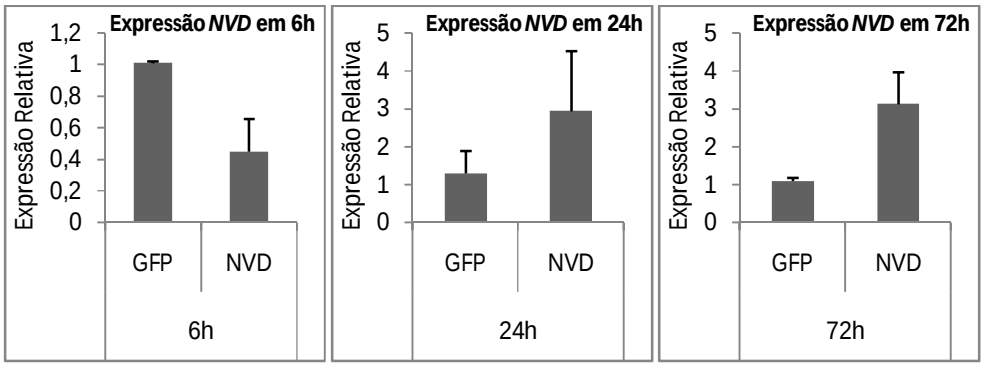

Figura 19 – Expressão relativa em lagartas do 4º instar após tratamento (*NVD*) e controle (*GFP*) com gota contendo 1,5 µg de dsRNA por indivíduo. O nível de expressão foi quantificado por RT-qPCR com o erro padrão mostrado pela barra de erro (*n*=3) e utilizando *RPS19* como gene referência em três momentos, 6 h, 24 h e 72 h após tratamento.

Nas análises de expressão relativa do gene *Quitina Sintase*, onde cada lagarta recebeu 1,6 µg de dsRNA, pôde-se observar a redução no acúmulo de transcritos de apenas 24 h após tratamento de, onde houve um decréscimo médio de 44% em transcritos. Em 72 h, houve aumento de 16% da expressão relativa, e em 6 h o valor dobrou, atingindo um aumento de 119% (Figura 20).

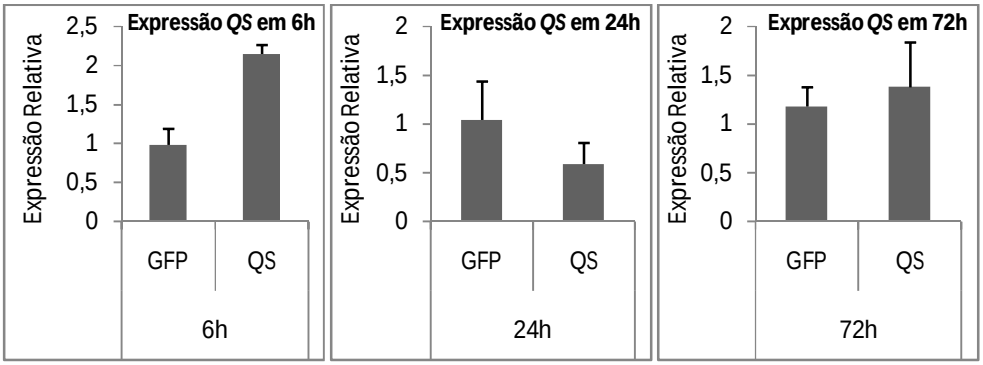

Figura 20 – Expressão relativa em lagartas do 4º instar após tratamento (*QS*) e controle (*GFP*) com gota contendo 1,6 µg de dsRNA por indivíduo. O nível de expressão foi quantificado por RT-qPCR com o erro padrão mostrado pela barra de erro (n=3) e utilizando *RPS19* como gene referência em três momentos tempos, 6 h, 24 h e 72 h após tratamento.

Existe uma grande variação entre as espécies de lepidópteros em relação à sua sensibilidade para RNAi, sendo que já foram descritas respostas de nenhum até elevado silenciamento sob concentrações de dsRNA contrastantes (TERENIUS et al., 2011). Nos ensaios realizados com as lagartas de quarto instar, podemos observar que apenas o tratamento com o dsRNA referente ao gene *V-ATPase* apresentou uma tendência consistente de silenciamento nas três amostragens realizada. Tendo em vista que para este gene foi utilizada a maior dosagem de dsRNA entre os genes, podemos sugerir que a *D. saccharalis* é uma espécie com elevada recalcitrância à aplicação de dsRNA, tendo sido eficiente para o gene *V-ATPase* a dosagem de 3,3 µg de dsRNA por lagarta, apresentando uma silenciamento de até 76% na expressão do gene alvo.

Com exceção do gene *V-ATPase*, a expressão de transcritos variou muito entre os tratamentos, o que limita as conclusões sobre os tratamentos. No caso do gene AK, houve também uma tendência de silenciamento, mas em menor escala do que a observada para *V-ATPaseA*. Para os outros genes, houve redução no acúmulo de transcritos em pelo menos um dos momentos analisados (*EcR* a 6 e 72 h; *JHEH* a 6 h; *NVD* a 6 h; *QS* a 24 h). Embora diversos fatores possam ter interferido na grande variação no nível de expressão relativa nos tratamentos, pode-se citar a quantidade de dsRNA entregue nos tratamentos que não foi constante. A maior quantidade foi utilizada justamente no tratamento com *V-ATPase*, e talvez por conta disso tenha apresentado um melhor resultado. A fim de diminuir o erro gerado no experimento, poderia ter sido utilizado um número maior de replicatas (lagartas por experimento) e ter havido repetições do experimento em momentos diferentes.

Outro fator se refere ao uso do controle negativo empregando dsRNA de *GFP*. Embora o gene *GFP* seja amplamente utilizado como controle negativo em ensaios de RNAi, existe uma possibilidade que ele exerça um efeito sob a expressão de certos genes do inseto. Este efeito da ingestão de dsRNA para o gene *GFP* foi demonstrado em abelhas (*Apis mellifera*), onde realizou-se RNA-seq de amostras tratadas ou não com dsRNA referente a GFP (NUNES et al., 2013). A expressão significativamente diferencial foi confirmada para 1.461 genes, sendo 1.015 apresentando expressão acima da amostra sem a aplicação de dsRNA de GFP e 446 apresentando expressão inferior (NUNES et al., 2013). Efeitos em genes não-alvos podem ser amplos e podem alterar a expressão de um grande número de genes (KULKARNI et al., 2006). Estes efeitos provocados pelo dsRNA do *GFP* retratado em abelhas, aparenta ser multifatorial. A partir de um único dsRNA, o efeito em genes não-alvos são específicos para diferentes tipos de células ou estágio de desenvolvimento, porque o conjunto de genes expressos (e desregulados) podem ser diferentes em cada contexto biológico (NUNES et al., 2013). Considerando esse efeito de GFP, é legítimo considerar que outros genes deveriam ser usados como controle negativo nos ensaios de RNAi.

Outros genes exógenos foram cogitados para exercer esta função, como por exemplo, *CRTISO*, que faz parte da via de biossíntese dos carotenóides e o gene GUS, utilizado como repórter por alguns plasmídeos. O uso de solução sem dsRNA também é frequente em trabalhos com RNAi em insetos, utilizando como controle negativo soluções contendo apenas água ou o mesmo tampão utilizado para a dissolução de dsRNA. Por isso, optou-se, então, trabalhar com uma solução “branco”, ou seja, sem a presença de qualquer fita dupla, contendo apenas sacarose e corante.

4.5.2. Dose resposta por gota em lagartas neonatas

Para otimizar a concentração de dsRNA fornecido por gotas para lagartas neonatas (1º instar), foi conduzido um experimento de dose-resposta com 3 concentrações de dsRNA do gene *V-ATPase*. Nos ensaios com lagartas de quarto instar uma massa específica de dsRNA foi fornecido às lagartas, mas neste modelo de ensaio a quantidade de dsRNA é variável devido ao volume que cada lagarta irá ingerir da solução. Embora estes experimentos não possam ser diretamente comparáveis, as concentrações utilizadas foram estipuladas com base nos resultados obtidos, de modo a encontrar a menor concentração com eficiência para induzir o efeito de RNAi. Deste modo, foram testadas as concentrações de 1,7 µg μL^{-1}, 2,5 µg μL^{-1}, e 3,3 µg μL^{-1} de dsRNA. Foram realizados três ensaios independentes com três repetições

biológicas cada, contendo aproximadamente 120 lagartas por placa, a fim de retirar 3 amostras de 30 lagartas para expresção de RNA. Foram incluídos o controle negativo dsRNA do gene *GFP* nas mesmas concentrações da *V-ATPase* e um controle negativo "branco", com solução sem conter dsRNA.

Para obter as concentrações necessárias de dsRNA foi necessário concentrar as amostras por centrifugação à vácuo. A integridade das amostras após o tratamento foi verificada, comparando uma alíquota contendo 500 ng de amostra sem secar com a mesma quantidade de amostra seca de V-*ATPAse sub A* e *GFP*, em gel de eletroforese 1,2% agarose (Figura 21). Não foi detectada perda de qualidade nas amostras após a secagem.

As lagartas recém eclodidas de *D. saccharalis* foram postas para se alimentar por 24 h em placas de Petri com solução à disposição, de modo que não faltasse alimento (Figura 22). As lagartas foram então coletadas e utilizadas para extração de RNA e síntese de cDNA. Pôde-se notar que nos ensaios, apenas o controle branco era completamente ingerido, com necessidade de reposição na maioria dos casos. No entanto, embora uma parte da solução disponível não tenha sido consumido, podia-se identificar traços de coloração azul nas lagartas, indicando que as mesmas haviam ingerido a solução de dsRNA.

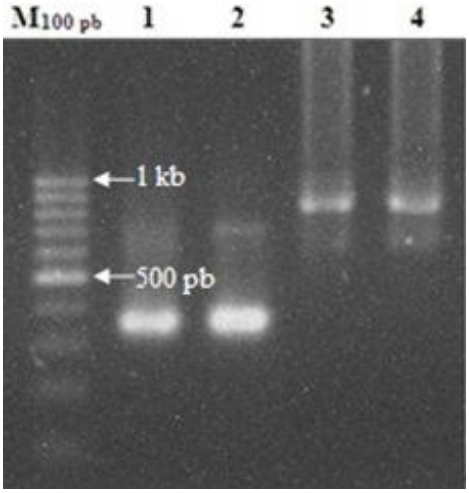

Figura 21 – Gel de 1,2% agarose para avaliação da integridade do dsRNA após secagem por centrifugação a vácuo. A primeira canaleta contem Marcador molecular de 100 pb ; Canaleta 1 e 2: amostras de dsRNA de *GFP*, com 316 pb, sem secar (1) e após secagem (2); Canaletas 3 e 4: dsRNA de *V-ATPase*, apresentando 816 pb, , sem secar (3) e após secagem (4).

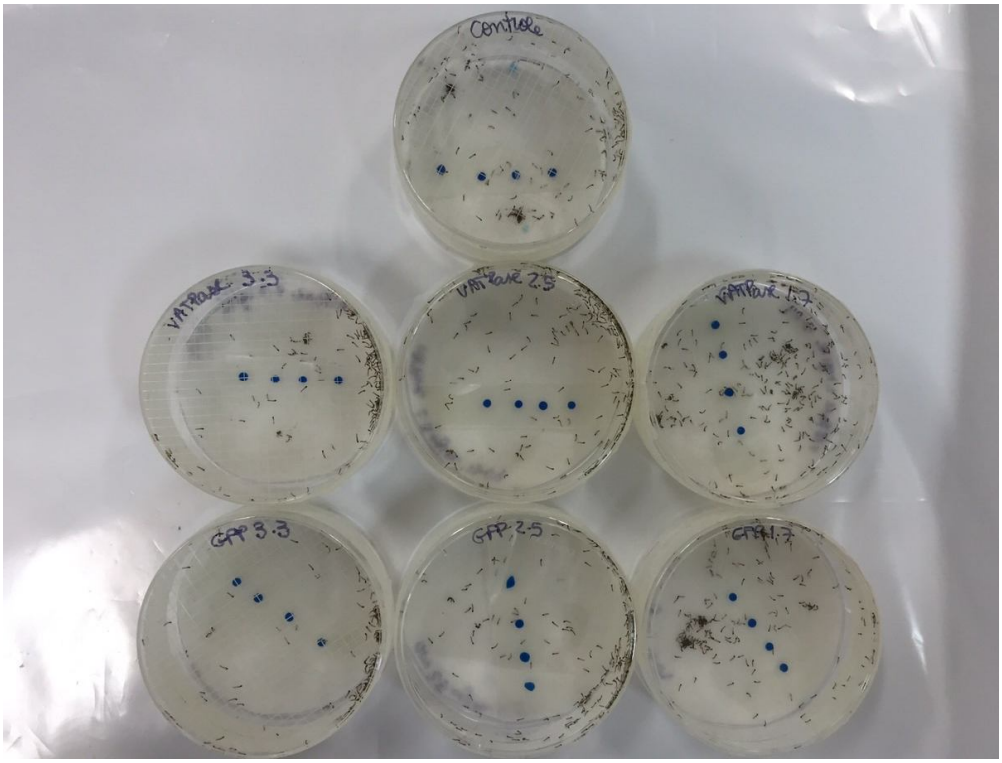

Figura 22 – Visão do experimento de dose resposta fornecendo dsRNA de *V-ATPase* e *GFP*. Cada placa continha aproximadamente 120 lagartas recém eclodidas (1º instar). Primeira linha: placas controle negativo contendo solução branco; segunda linha: tratamento contendo dsRNA para o gene *V-ATPase* nas concentrações em ordem decrescente: 3,3; 2,5 e 1,7 µg.µL^{-1}; terceira linha: tratamento controle com dsRNA para o gene GFP nas mesmas concentrações do gene-alvo.

Devido aos resultados obtidos previamente, as análises de expressão por RT-qPCR foram conduzidas relativas a expressão do controle negativo branco, sem dsRNA. A análise de expressão dos três experimentos unificados revelaram que houve apenas uma redução significativa no acúmulo de transcritos do gene *V-ATPase* no tratamento utilizando a 2,5 µg µL^{-1} (Figura 23 B), que apresentou redução de 52% da expressão relativa ao controle sem dsRNA, sendo que nas outras duas concentrações, 1,7 µg µL^{-1} e 3,3 µg µL^{-1}, não houve diferença estatística entre os tratamentos de concentração de dsRNA (Figura 23 A e C), com redução aparente de 18% na expressão relativa de cada uma delas.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de dose resposta para o gene *V-ATPase*, a concentração de 2,5 µg.µL^{-1} foi selecionada para dar continuidade nos experimentos por gota e avaliar o comportamento dos outros genes alvos em lagartas neonatas de *D. saccharalis*.

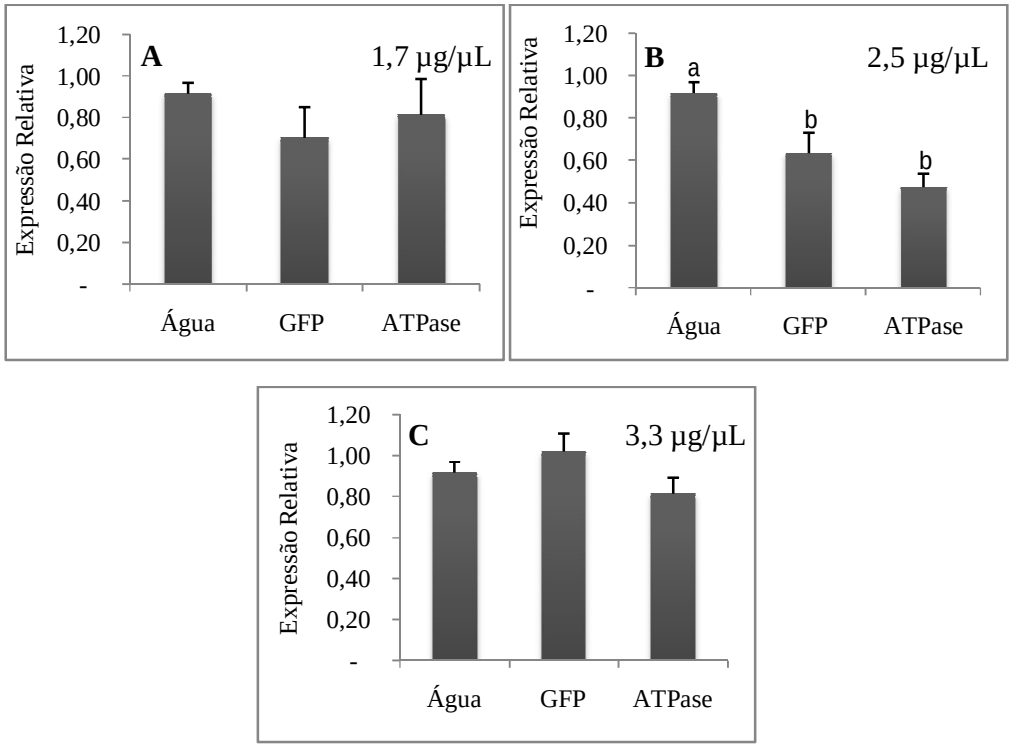

Figura 23 – Análise de expressão dos experimentos de dose resposta por gota com o gene *V-ATPase* em lagartas neonatas. O nível de expressão foi quantificado por RT-qPCR com o erro padrão mostrado pela barra (*n*=9) e utilizando o gene *RPS19* como referência. (A) expressão para a concentração de 1,7 µg μL^{-1}, não apresentando diferença significativa na expressão do gene, (B) para 2,5 µg μL^{-1} sendo o tratamento branco diferente estatisticamente do *GFP* e do *V-ATPas*e e, (C) para 3,3 µg μL^{-1}, também sem apresentar diferença significante.

Em *H. armigera* a entrega de dsRNA foi otimizada para a ingestão de dieta artificial contendo bactérias expressando a dupla fita do gene *quitinase* e o fator que mais afetou a eficiência do silenciamento foi a concentração de dsRNA fornecido (YANG; HAN, 2014b). Observou-se que o aumento de silenciamento foi linear até a dosagem de 10,625 µg por dia, porém, acima desta, o efeito foi estagnado, indicando um possível nível de saturação (YANG; HAN, 2014b).

4.5.3. Via Gota em lagartas neonatas com todos os genes

Os ensaios por fornecimento de dsRNA por gota para lagartas neonatas de *D. saccharalis* foram então conduzidos empregando a concentração padrão de 2,5 µg μL^{-1} para todos os seis genes alvo. O experimento foi realizado em triplicatas independentes, cada uma com três replicatas biológicas contendo 30 lagartas cada, adotando como controle negativo

branco e também o dsRNA do gene *GFP*. Porém, a terceira repetição do experimento, apresentou inconformidades e por isso foi excluído das análises estatísticas, sendo estas, realizadas apenas com as duas repetições independentes.

A análise de expressão relativa do gene *V-ATPase* em lagartas de 1º instar apresentou diferenças significativas, com redução de 50% da expressão relativa ao controle branco, mas sem diferenças significativas em relação ao controle *GFP* (Figura 24 A). Para o gene *EcR*, a redução no acúmulo de transcritos foi significativa em 52% em relação ao controle água, mas também não houve diferença significativa com o tratamento dsRNA de *GFP* (Figura 24 B). Estudos realizados com *H. armigera* obtiveram redução de 60 até 80% de expressão relativa em tabaco transgênico expressando *hairpin* de uma região do gene *EcR* (ZHU et al., 2012). Para *H. armigera* alimentadas a partir do terceiro instar com dieta acrescida de bactérias expressando o dsRNA de *EcR*, houve diferenças no fenótipo no decorrer do desenvolvimento, apresentando defeito na ecdise do inseto e mortalidade em lagartas antes da pupagem (YANG; HAN, 2014a). Houve redução significativa no acúmulo de transcritos de *AK* de 37% em relação ao controle branco, mas o tratamento com dsRNA de *GFP* não apresentou diferenças significativa no acúmulo de transcritos tanto para o tratamento com *AK*, quanto o branco (Figura 24 C). Da mesma forma, a expressão relativa de *JHEH* nas larvas apresentou uma redução significativa de 19% no acúmulo de transcritos em relação ao controle desprovido de dsRNA. Já o controle *GFP* não apresentou diferença significante entre os tratamentos (Figura 24 D). O gene *NVD* foi o único que não apresentou diferença significativa para acúmulo de transcritos entre os tratamentos e controle branco desprovido de dsRNA (Figura 24E). Porém, não se pode afirmar que este dsRNA não afeta a expressão deste gene em *D. saccharalis*, pois pode haver efeito da concentração de dsRNA neste estádio de desenvolvimento (neonatas) e para este método de entrega não foi eficiente. A otimização das condições de RNAi para cada gene específico ainda é necessária antes de se alcançar qualquer resultado prático (YANG, HAN, 2014b). Para o gene *QS*, houve uma redução de 55% da expressão relativa do gene alvo no inseto em relação ao controle, mas sem diferença significativa em relação ao tratamento com dsRNA de *GFP*, que se também distinguiu significativamente do controle (Figura 24F).

A metodologia utilizada para a entrega de dsRNA parece ser eficiente, porém, o fator limitante é a quantidade de dsRNA necessária para se atingir resultados em *D. saccharalis*. Este fato demonstra a pouca sensibilidade do inseto em relação à indução de silenciamento via RNAi. Esta recalcitrância foi reportada em Lepidoptera, podendo ela variarentre as

diferentes espécies, sendo que elevado ou nenhum silenciamento pode ocorrer em concentrações muito diferentes de dsRNA (TERENIUS et al., 2011).

O próximo passo para este estudo seria realizar testes para avaliação de fenótipo, possivelmente incorporando o dsRNA em dieta artificial durante todo seu desenvolvimento larval, mas como o efeito de silenciamento é observado apenas sob alta dose de dsRNA, necessita-se de uma forma eficiente e efetiva de produção de dsRNA. Existe como alternativas a produção *in vitro*, que ainda possui um custo elevado, ou a produção via bactéria transformada expressando o dsRNA do gene alvo, viabilizando assim a produção necessária para montagem de ensaios do gênero. Uma alternativa poderia ser o emprego de dsRNA sintéticos, obtidos comercialmente. Como exemplo, a empresa AgroRNA da Coréia do Sul oferecea produção em escala de dsRNA sintéticos a custos cada vez mais competitivos para ensaios de avaliação e para ensaios de campo.

Para a produção de dsRNA por plantas transgênicas ser efetiva, é necessário ter uma alta produção de *hairpin* (que gera o dsRNA após sua transcrição) e com isso um promotor forte. Mas para não haver desvios metabólicos na síntese de um gene e em alta quantidade, seria recomendável empregar promotor indutível pela herbivoria do inseto, evitando assim, gastos energéticos desnecessários. Há também a opção de transformação protoplástica (transformando o genoma dos plastídeos), acumulando assim o dsRNA nos cloroplastos da planta, conforme foi descrito para o controle do *Leptinotarsa decemlineata* em tabaco (ZHANG et al., 2015). Por outro lado, *D. saccharalis* se alimenta de colmo da cana, onde possivelmente há baixo acúmulo desta organela, necessitando assim, maiores estudos para analisar a viabilidade desta técnica.

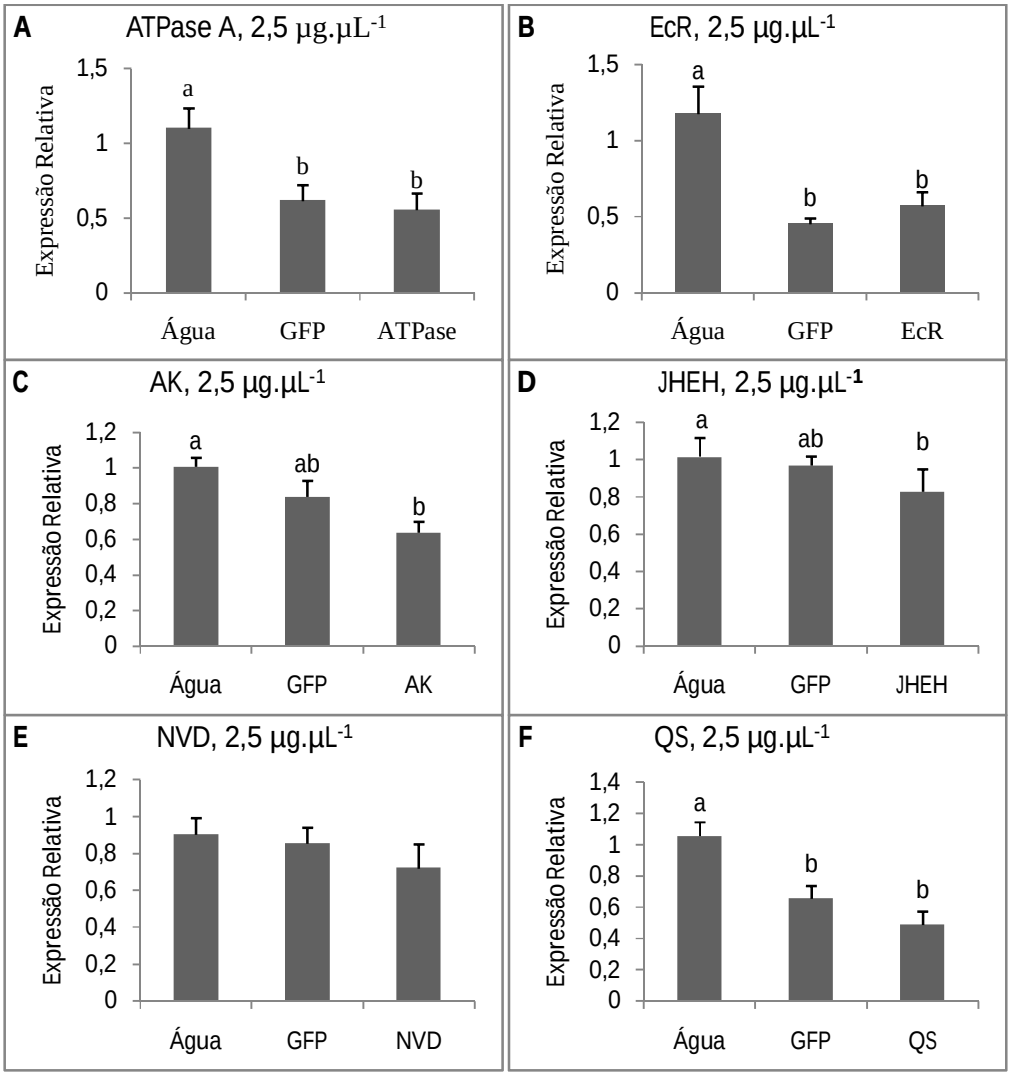

Figura 24 – Análise de expressão relativa dos genes alvos dos ensaios com neonatas por gota contendo dsRNA na concentração de 2,5 µg.µL^{-1}de dsRNA em solução. O nível de expressão foi quantificado por RT-qPCR com o erro padrão mostrado pela barra (n=6) e utilizando o gene *RPS19* como referência. Onde (A): Representa o valor de expressão relativa para o gene *V-ATPase* que mostra o tratamento branco diferente estatisticamente dos demais; (B): Valor de expressão do gene *EcR*, tratamento branco deferente dos demais; (C): Valor de expressão do gene *AK*, onde o *GFP* não apresentou diferença estatística com os outros tratamentos e o branco diferiu do gene alvo; (D): Valor de expressão do gene *JHEH*, o *GFP* também não apresentou diferença estatística com os outros tratamentos e o branco diferiu do gene alvo; (E): Valor de expressão do gene *NVD*, não apresentou diferença significante entre os tratamentos; (F): Valor de expressão do gene *QS*, o branco diferiu dos demais tratamentos.

5. CONCLUSÕES

A ingestão da molécula de fita dupla correspondente a regiões de gene alvo é funcional em *D. saccharalis* induzindo assim, o sistema de RNAi do inseto;

O fornecimento de dsRNA por meio de oferecimento de gotas para lagartas de 1º instar permitiu o silenciamento de genes alvo do inseto;

A concentração de 2,5 µg μL^{-1} de dsRNA de fragmento do gene *ATPase Vacuolar, subunidade A* foi a que apresentou redução significativa no número de transcritos do gene alvo em lagartas de 1º instar;

Para os genes *receptor de Ecdisona*, *Arginina Kinase*, *Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase* e *Quitina Sintase*, a concentração 2,5 µg μL^{-1} de dsRNA em ensaios por gota para lagartas neonatas também apresentou redução significativa na quantidade de transcritos;

Não foi constatado o silenciamento significativo do gene *Neverland* em neonatas alimentadas com solução contendo 2,5 µg μL^{-1} de dsRNA;

O fragmento utilizado para controle negativo do gene *GFP* apresentou influência na expressão dos genes *V-ATPase*, *EcR* e *QS* em comparação com um controle negativo branco, em estudos em lagartas neonatas de *D. saccharalis*.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M.D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, Washington, DC, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, 2000.

ALAN, M.M. Biological and ecological factors affecting populations of sugarcane moth-borer, *Diatraea saccharalis* (Lep.: Pyralidae) Barbados, W. I. **Entomophaga**, Paris, v. 25, n. 4, p. 401-414, 1980.

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Chicago, v. 64, p. 5245-5250, 2004.

ARONSTEIN, K.; PANKIW, T.; SALDIVAR, E. SID-1 is implicated in systemic gene silencing in the honey bee. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 45, p. 20-24, 2006.

ASOKAN, R.; CHANDRA, G.S.; MANAMOHAN, M.; KUMAR, N.K.K. Effect of diet delivered various concentrations of Double-stranded RNA in silencing a midgut and a non-midgut gene of *Helicoverpa armigera*. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 103, p. 555-563, 2013. DOI: 10.1017/S000748531300138.

ASSOCIAÇÃO DOS PLANTADORES DE CANA DO OESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO – CANAOESTE. Pragas na cana. Sertãozinho, SP, 06 jun. 2013. Disponível em: <http://www.canaoeste.com.br/conteudo/pragas-na-cana>. Acesso em: 15 jul. 2015.

BAUM, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, n. 11, p. 1322-1326, 2007.

BAUTISTA, M.A.M.; MIYATA, T.; MIURA, K.; TANAKA, T. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 39, p. 38-46, 2009. DOI: 10.1016/j.ibmb.2008.09.005.

BISCHOFF, V.; VIGNAL, C.; DUVIC, B.; BONECA, I. G.; HOFFMANN, J. A.; ROYET, J. Down regulation of the Drosophila immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v.2, p.139–147, 2006.

BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CÔRREA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. cap. 25, p. 409-425.

BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; CHAGAS NETO, J.F.; OLIVEIRA, C.P.B. Associação do parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 491-496, 1999.

BRAGG, J.; RAJKOVIC, A.; ANDERSON, C.; CURTIS, R.; VAN HOUTEN, J.; BEGRES, B.; NAPLES, C.; SNIDER, M.; FRAGA, D.; SINGER, M. Identification and characterization of a putative arginine kinase homolog from *Myxococcus xanthus* required for fruiting body formation and cell differentiation. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 194, n. 10, p. 2668-2676, 2012.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Natick, v. 36, p. 214-216, 2004.

CAMARGO, R.A. **RNAi para o controle de *Tuta absoluta* em tomateiro**. 2013, 110p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

CAMARGO, R.A.; HERAI, R.H.; SANTOS, L.N.; BENTO, F.M.M.; LIMA, J.E.; MARQUES-SOUZA, H.; FIGUEIRA, A. *De novo* transcriptome assemblyand analysis to identify potential gene targets for RNAi-mediated control of the tomato leafminer (*Tuta absoluta*). **BMC Genomics**, London, v. 16, p. 635-651, 2015. DOI: 10.1186/s12864-015-1841-5.

CHEN, J.; ZHANG,D.; YAO, Q.; ZHANG, J.; TIAN, H.; CHEN, J.; ZHAN, W.Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown plant hopper, *Nilaparvata lugens*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 777-786, 2010.

CHEN, X.; TIN, H.; ZOU, L.; TANG, B.; ZHANG, W. Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 98, n. 6, p. 613-619, 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO _ CONAB. **Acompanhamento de Safra Brasileira de Cana-de-açúcar 2014/15** - Quarto Levantamento. Brasília, DF: CONAB, 2015.

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALON, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics,** Oxford, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.

DE LOOF A. Ecdysteroids, juvenile hormone as insect neuropeptides: Recent successes and remaining major challenges. **General and Comparative Endocrinology.** v. 155, p. 3-13, 2008.

DESCHAMPS, S.; CAMPBELL, M.A. Utilization of next-generation sequencing platforms in plant genomics and genetic variant discovery. **Molecular Breeding**, Heidelberg, v. 25, n. 4, p. 553-570, 2010.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Pragas, p. 349-404. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar.** 1° Ed. Campinas: Instituto Agronômico, 2008, v. 1, p. 882.

EMBRAPA. **Árvore do conhecimento**: cana-de-açúcar. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2009. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_93_22122006154841.html>. Acesso em: 17 ago. 2015.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FIRMINO, A. A.; FONSECA, F. C.; MACEDO, L. L.; COELHO, R. R.; ANTONINO DE SOUZA JUNIOR, J. D.; TOGAWA, R. C.; SILVA-JUNIOR, O. B.; PAPPAS-JUNIOR, G. J.; SILVA, M. C.; ENGLER, G.; GROSSI-DE-SA, M. F. Transcriptome analysis in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA interference in insect pests. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 12, e. 85079, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0085079.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.D.E; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Manual de entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GARBUTT, J.S.; REYNOLDS, S.E. Induction of RNA interference gene by double-stranded RNA; implications for susceptibility to RNA interference. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**.Oxford, v. 42, p. 621-628, 2012.

GORDON, K.H.J.; WATERHOUSE, P.M. RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, n. 11, p. 1231-1232, 2007.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, London, v. 418, n. 6894, p. 244-251, 2002.

HASS, B.J.; ZODY, M.C. Advancing RNA-seq analysis. **Nature Biotechnology**, New York, v. 28, n. 5, p. 421-423, 2010.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley, CA: University of California, Agriculture Experimental Station, 1950. (Circular, 347).

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

JIN, S.; SINGH, N.D.; LI, L.; ZHANG, X.; DANIELL, H. Engineered chloroplast dsRNA silences *cytochrome p450 monooxydase, V-ATPase* e *chitin syntase* genes in the insect gut and disrupts *Helicoverpa armigera* larval development and pupation. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 13, p. 435-446, 2015. DOI: 10.1111/pbi.12355.

KATOCH, K.; SETHI, A.; TAKHUR, N.; MURDOCK, L.L. RNAi for insect control: current perspective and future challenges. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 171, p. 847-873, 2013.

KENNERDELL, J.R.; CARTHEW, R.W. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 896-898, 2000.

KLOWDEN, M.J. Endocrine systems. Em: KLOWDEN, M.J., editor. Physiological systems in insects., 2° edição. Burlington, MA: Academic Press. p. 1-49, 2007.

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

KOLA, V.S.R.; RENUKA, P.; MADHAV, M.S.; MANGRAUTHIA, S.K. Key enzymes and proteins of crop insects as candidate for RNAi bases gene silencing. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 6, p. 119, 2015. DOI: 10.3389/fphys.2015.00119.

KULKARNI, M.M.; BOOKER, M.; SILVER, S.J.; FRIEDMAN, A.; HONG, P.; PERRRIMON, N.; MATHEY-PREVOT, B. Evidence of off-target effects associated with long dsRNA in *Drosophila melanogaster* cell-based assays. **Nature Methods**, New York, v. 3, n. 10, p. 833-838, 2006. DOI: 10.1038/NMETH935.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.;McGETTIGAN, P.A.; McWILLIAM, H.;VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LAWRENCE, L. G., SARJEET, G., KOSTAS, I. **Comprehensive molecular insect science**. v.3: Endocrinology. Kidlington: Pergamon, 2005. 896p.

LI, H.: JIANG, W.; ZHANG, Z.; XING, Y.; LI, F. Transcriptome analysis and screening for potencial target genes for RNAi-mediated pest control of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 6, e. 65931, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0065931.

LI, T.R.; BENDER, M.A conditional rescue system reveals essential functions for the ecdysone receptor (EcR) gene during molting and metamorphosis in *Drosophila*. **Development**, Cambridge, v. 127, n. 13, p. 2897-2905, 2000.

LI, X.; ZHANG, M.; ZHANG, H. RNA Interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 3, e17788, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0017788.

LIMA FILHO, M.; LIMA, J.O.G. Massa de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae) em cana-de-açúcar: número de ovos e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma spp*. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições de campo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 483-487, 2001.

LONG, W.H.; HENSLEY, S.D. Insect pests of sugarcane. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 17, p. 149-176, 1972. DOI: 10.1146/annurev.en.17.010172.001053.

MACEDO, N., ARAÚJO, J.R. Efeitos da queima do canavial sobre insetos predadores. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 79-84, 2000.

MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M. Controle integrado da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae). **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 162, n. 2, p. 2-11, 1988.

MAO, Y.B.; CAI, W.J.; WANG, J.W.; HONG, G.J.; TAO, X.Y.; WANG, L.J.; HUANG, Y.P.; CHEN, X.Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, n. 11, p. 1307-1313, 2007.

MAO, Y.B.; TAO, X.Y.; XUE, X.Y.; WANG, L.J.; CHEN, X.Y. Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. **Transgenic Research**, London, v. 20, n. 3, p. 665-673, 2011.

MARCHAL, E.; VERLINDEN, H.; BADISCO, L.; VAN WIELENDAELE, P.; BROECK, J.V. RNAi-mediated knockdown of Shade negatively affects ecdysone-20-hydroxylation in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 58, p. 890–896, 2012.

MARDIS, E.R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 24, n. 3, p. 133-141, 2008.

MARQUES-SOUZA, H.; ARANDA, M.; BAYER, T.; TAUTZ, D. The role of the segmentation gene hairy in *Tribolium*. **Development Genes and Evolution**, Berlin, v. 218, n. 9, p. 465-477, 2008.

MEISTER, G., TUSCHI, T. Mechanisms of gene silencing by Double stranded RNA. **Nature**. London. v. 431, p. 343-349, 2004.

MENDONÇA, A.F.; BARBOSA, G.V.S.; MARQUES, E.J. As cigarrinhas da cana-de-açúcar no Brasil,p. 171-192. In: MENDONÇA, A.F. (ed), **Pragas da cana-de-açúcar.** Maceió: Ed.do autor, p. 239, 1996.

MILLER, S.C.; BROWN, S.J.; TOMOYASU, Y. Larval RNAi in Drosophila? **Development Genes and Evolution**, Berlin, v.218, p.505–510, 2008.

MIYATA, K.; RAMASESHADRI, P.; ZHANG, Y.; SEGER, G.; BOLOGNESI, R.; TOMOYASU, Y. Establishing an *in vivo* assay system to identify components envolved in environmental RNA interference in the western corn rootworm. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 7, e101661, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0101661.

MOROZOVA, O.; MARRA, M.A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, Orlando, v. 92, n. 5, p. 255-264, 2008.

NORDBORG, M.; WEIGEL, D. Next-generation genetics in plants. **Nature**, London, v. 456, n. 7223, p. 720-723, 2008.

NOVAES, E.; DROST, D.R.; FARMERIE, W.G.; PAPPAS-JUNIOR, G.J.; GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R.R.; KIRST, K. High-throughput gene and SNP discovery in *Eucalyptus grandis*, an uncharacterized genome. **BMC Genomics**, London, v. 9, p. 312-329, 2008.

NUNES, F.M.F.; ALEIXO, A.C.; BARCHUK, A.R.; BOMTORIN, A.D.; GROZINGER, C.M.; SIMÕES, Z.L.P.Non-target effects of *Green Fluorescent Protein* (*GFP*)-Derived Double-Stranded RNA (dsRNA-GFP) used in honey bee RNA Interference (RNAi) Assays. **Insects**, Basel, v. 4, p. 90-103, 2013. DOI: 10.3390/insects4010090.

OHNISHI, A.; HULL, J.J.; MATSUMOTO, S. Targeted disruption of genes in the *Bombyx mori* sex pheromone biosynthetic pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v.103, p. 4398–4403, 2006.

PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. Trichogramma in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 271-281, 2004.

PAULILLO, L.C.M.S.; SEBBENN, A.M.; de CARVALHO DERBYSHIRE, M.T.; GÓES-NETO, A.; de PAULA BROTTO, M.A.; FIGUEIRA, A. Evaluation of in vitro and in vivo effects of semipurified proteinase inhibitors from theobroma seeds on midgut protease activity of lepidopteran pest insects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.81, n. 1, 34-52, 2012.

PEREIRA, T.C. **Introdução à Técnica de Interferência por RNA – RNAi**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2013. 161 p.

PEREZ, R.; LONG, H.W. Sex attractant and mating behaviour is the sugarcane borer**. Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 57, n. 5, p. 688-690, 1964.

PINTO, A.S. **Comparação de técnicas de liberação e parasitismo de *Trichogramma galloi Zucchi*, 1988, em infestações de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794), prejudiciais à cana-de-açúcar.** 1999. 83p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

PRICE, D.R.G.; GATEHOUSE, J.A. RNAi-mediated crop protection against insects.**Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 26, n. 7, p. 393-400, 2008.

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

REVISTA CANAVIEIROS. **CTC lançará primeira variedade de cana transgênica no início de 2017**. Sertãozinho, 2015. Disponível em: <http://www.revistacanavieiros.com.br/conteudo/ctc-lancara1-variedade-de-cana-transgenica-no-inicio-de2017>. Acesso em: 17 ago. 2015.

RICHARDS, S. et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, London, v. 452, n. 7190, p. 949-955, 2008.

ROIGNANT, J.Y.; CARRÉ, C.; MUGAT, B.; SZYMCZAK, D.; LEPESANT, J.A.; ANTONIEWSKI, C. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in Drosophila. **RNA**, New York, v.9, p.299–308, 2003.

ROSA, C.; KAMITA, S. G.; DEQUINE, H.; WURIYANGHAN, H.; LINDBO, J. A.; FALK, B. W. RNAi effects on actin mRNAs in *Homalodisca vitripennis* cells. **Journal of RNAi and Gene Silencing**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 361-366, 2010.

SAVARD, J.; TAUTZ, D.; LERCHER, M.J. Genome-wide acceleration of protein evolution in flies (Diptera). **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 6, p. 7, 2006.

SCHULTZ, M.H.; ZERBINO, D.R.; VINGRON, M.; BIRNEY, E. Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 1086-1092, 2012.

TERENIUS, O. et al. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **Journal of Insect Physiology**. London. v. 57, p. 231-245, 2011. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2010.11.006.

THAKUR, N.; UPADHYAY, S.K.; VERMA, P.C.; CHANDRASHEKAR, K.; TULI, R.; SINGH, P.K. Enhanced whitefly resistence in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase A gene. **PLoS One**, San Francisco,v. 9, n. 3, e87235, 2014.

TIAN, H.G.; PENG, H.; YAO, Q.; CHEN, H.; XIE, Q.; TANG, B.; ZHANG, W. Developmental Control of a Lepidopteran Pest *Spodoptera exigua* by Ingestion of Bacteria Expressing dsRNA of a Non-Midgut Gene. **PLoS One**, San Francisco,v. 4, n. 7, e6225, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0006225.

TOMOYASU, Y.; DENELL, R.E. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. **Development Genes and Evolution**, Berlin, v.214, p.575–578, 2004.

TOMOYASU, Y.; MILLER, S.C.; TOMITA, S.; SCHOPPMEIER, M.; GROSSMANN, D.; BUCHER, G. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. **Genome Biology**. London, v. 9, n. 1, R10, 2008. DOI: 10.1186/gb.

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

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, p. 34.1-34.12, 2002.

WALKER, D.W. Bionomics of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fab.). I. A description of the mating behavior. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, Washington, DC, v. 67, n. 2, p. 80-83, 1965.

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

WINSTON, W.M.; MOLODOWITCH, C.; HUNTER, C.P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. **Science**, Washington, DC, v. 295, n. 5564, p. 2456-2459, 2002.

WANG, Y.; ZHANG, H.; LI, H.; MIAO, X. Second-Generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 4, e18644, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0018644.

WHYARD, S. Insecticidal RNA, the long and short of it. **Science**. V. 347, e. 6225, p. 950-51, 2015. DOI: 10.1126/science.aaa7722.

WYNANT, N.; SANTOS, D.; VANDEN BROECK, J. Biological mechanisms determining the success of RNA interference in insects. **International Review of Cell and Molecular Biology.** v.312, p. 139-167. 2014. DOI: 10.1016/B978-0-12-800178-3.00005-1.

XIA, Q. et al. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). **Science**, Washington, DC, v. 306, n. 5703, p. 1937-1940, 2004.

XIA, Q.; LI, S.; FENG, Q. Advances in silkworm studies accelerated by the genome sequencing of *Bombyx mori*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 59, p. 513–536, 2013. DOI: 10.1146/annurev-ento-011613-161940.

YANG, J.; HAN, Z.J. Efficiency of different methods for dsRNA delivery in cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). **Journal of Integrative Agriculture**, Beijing, v. 13, n. 1, p. 115-123, 2014a.

YANG, J.; HAN, J.H. Optimization of RNA interference-mediated gene silencing in *Helicoverpa armigera*. **Austral Entomology.** v.53, p. 83-88, 2014b. DOI: 10.1111/aen.12052.

YANG, Y.; ZHU, Y. C.; OTTEA, J.; HUSSENEDER, C.; LEONARD, B.R.; ABEL, C.; HUANG, F. Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isoenzymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and –resistent strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Oxford, v. 40, p. 592-603, 2010. DOI: 10.1016/j.ibmb.2010.05.006.

YANG, Y.; ZHU, Y.C.; OTTEA, J.; HUSSENEDER, C.; LEONARD, B.R.; ABEL, C.; LUTTRELL, R.; HUANG, F. Down regulation of a gene for Cadherin, but not Alkaline Phosphatase, associated with Cry1Ab resistence in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. **PLoS ONE.** San Francisco. v.6, n. 10, e25783. 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0025783.

YU, N.; CHRISTIAENS, O.; LIU, J.; NIU, J.; CAPPELLE, K.; CACCIA, S.; HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Delivery of dsRNA in insects: an overview and future directions. **Insect Science**, Hoboken, v. 20, p. 4-14, 2013. DOI: 10.1111/j. 1744-7917.2012.01534.x.

ZHANG, H.; LI, H.C.; MIAO, X.X. Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. **Insect Science**, Hoboken, v. 20, p. 15-30, 2013. DOI: 10.1111/j. 1744-7917.2012.01513.x.

ZHANG, J; KHAN, S.A.; HASSE, C.; RUF, S.; HECKEL, D.G.; BOCK, R. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. **Science**. V. 347, p. 991-94, 2015. DOI: 10.1126/science.1261680.

ZHAO, Y.Y.; LIU, F.; YANG, G.; YOU, M.S. PsOr1, a potential target for RNA interference-based pest management. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 97-104, 2011.

ZHAO, Y.; YANG, G.; PRUSKI, G.W.; YOU, M. *Phyllotreta striolata* (Coleoptera: Chrysomelidae): Arginine kinase cloning and RNAi-based pest control. **European Journal of Entomology**, Praha, v. 105, n. 5, p. 815-822, 2008.

ZHU, F.; XU, J.; PALLI, R.; FERGUSON, J.; PALLI, S.R. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. **Pest Management Science**, London, v. 67, n. 2, p. 175-182, 2010.

ZHU, J.-Q.; LIU, S.; MA, Y.; ZHANG, J.-Q.; QI, H.-S.; WEI, Z.-J.; YAO, Q.; ZHANG, W.-Q.; LI, S. Improvement of pest resistance in transgenic tabacco plants expressing dsRNA of an insect-associated gene *EcR*. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 6, e38572, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0038572.