

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

**Silenciamento gênico de *Diatraea saccharalis* utilizando a técnica de RNA
de interferência (RNAi)**

Bruna Garbatti Factor

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

**Piracicaba
2023**

Bruna Garbatti Factor
Engenheira Agrônoma

Silenciamento gênico de *Diatraea saccharalis* utilizando a técnica de RNA de interferência (RNAi)

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

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

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

Piracicaba
2023

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

Factor, Bruna Garbatti

Silenciamento gênico de *Diatraea saccharalis* utilizando a técnica de RNA de interferência (RNAi) / Bruna Garbatti Factor. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

254 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escolar Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Bactérias 2. Inseto-praga 3. RNA de interferência 4. Silenciamento pós transcricional I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico, com todo o amor do mundo, aos meus pais Tadeu e Suzana, que nunca mediram esforços para me apoiar, incentivar e me trazer até aqui. Esse Doutorado é prova do amor e apoio incondicional de vocês. Essa conquista não é minha, é nossa! Minha imensa e eterna gratidão! Amo vocês infinito e para sempre!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me abençoar todos os dias da minha vida, me proteger, iluminar meus caminhos e me dar forças para sempre seguir sempre em frente; e à Nossa Senhora, a quem minha mãe me colocou sob seus cuidados. Obrigada, Maria, por sempre passar na minha frente, me dando sabedoria e tranquilidade, e me protegendo sempre.

Aos meus pais, Tadeu e Suzana, que são minha vida. Obrigada por vocês terem se doado e, muitas vezes, renunciado de coisas para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Obrigada por me ensinarem a importância do estudo e me incentivarem a percorrer este caminho. Nunca se esqueçam que tudo o que eu alcancei só foi possível graças a você; graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Vocês são minha base na vida e no mundo. Certamente não chegaria onde estou sem vocês dois. Vocês são meu exemplo de superação e, em meio às dificuldades, se eu não desisti, foi porque me espelhei em vocês. Pai e mãe, meu muito obrigado! Dedico esse título e toda minha jornada a vocês. Amo vocês infinitamente e pra sempre!

Ao meu noivo, Lucas, nunca terei palavras suficientes para te agradecer. Você é a real definição de companheirismo. Obrigada por estar ao meu lado sempre, em todas as situações, sem exceção. Obrigada por me acompanhar ao CENA durante a madrugada para induzir bactérias e por me auxiliar com experimento de lagartas até 22h. Obrigada por sua imensa paciência comigo, principalmente nos momentos mais difíceis, de muita ansiedade, de estresse e medo. Obrigada por sua amizade, parceria, doação, apoio e ajuda incondicionais. Obrigada por me auxiliar nessa reta final, sempre me incentivando e oferecendo palavras positivas de que eu iria conseguir. Uma coisa é fato, sem você eu não teria conseguido! Obrigada, amor, mil vezes obrigada. Serei grata a você por toda a minha vida!

Às minhas irmãs Adriana e Raisa. Vocês sempre foram meu exemplo na vida e nos estudos. Mulheres guerreiras, determinadas e, claro, muito inteligentes. Tenho muito orgulho de ter vocês como irmãs. Obrigada por todo companheirismo, amizade e união de sempre. Obrigada por me terem feito tia do Lucas, da Bibi e do Mig (e dinda), que são pessoas que eu também amo incondicionalmente e que ocupam um lugar mais que especial no meu coração. Ser tia é uma das maiores bênçãos que já recebi. Amo vocês!

A todos os meus familiares, tias, primos, madrinha, padrinho e avós. Cada um, da sua forma, contribuiu de alguma maneira nessa jornada. Minha família é minha base. Obrigada pela união de sempre, família! Destaco, com carinho, o agradecimento ao meu avô Sebastião. “Vô Bastião”, no primeiro ano da minha pós-graduação o senhor partiu deste plano. Lembro o

quanto estava feliz por eu estar trilhando esse caminho. Assim como meu pai, o senhor sempre enfatizou a importância do estudo. Espero que hoje o senhor esteja orgulhoso de mim aí de cima. Saudades eternas.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, por oferecer um corpo docente de excelência, uma estrutura de qualidade ímpar, o melhor suporte acadêmico e acolhimento durante os onze anos de minha formação acadêmica. Orgulho de ser ESALQ!

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

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), processo número 2017/17882-7, pela concessão de bolsa no país.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Figueira, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim desde 2014. Professor, lhe agradeço por todo aprendizado e crescimento, pela confiança e por todos os valiosos ensinamentos nestes oito anos de convivência. Gratidão!

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, do Laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ-USP, pela parceria e por ter disponibilizado a estrutura do seu laboratório. Agradeço também à técnica Neide Graciano Zério, pela paciência, por ter me ensinado tudo sobre *Diatraea saccharalis* e ter sido sempre tão prestativa e gentil.

À Prof^a Dra. Maria Carolina Quecine Verdi, do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pela grande contribuição na parte de bactéria endofítica desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Paul Dyson, da Universidade de Swansea (Reino Unido), pela extrema atenção que me ofereceu, e pela grande oportunidade de desenvolver uma parceria no exterior.

Aos técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP, Felipe Campana (“Fe”) e Wlamir Godoy (“Mizinho”), por toda o auxílio que prestaram sempre. Obrigada por tudo!

A todos os colegas do LAMP, que compartilharam bancada no laboratório, salinha de estudo, momentos de tristeza, momentos de alegria, festinhas, muita diversão e aprendizados!

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

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”

(Robert Collier)

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1. O mecanismo de RNA de interferência (RNAi) e seu funcionamento em insetos	15
1.2. Aplicação do RNA de interferência (RNAi) para controle de insetos-praga	19
1.3. RNAi em lepidópteros	25
1.4. <i>Diatraea saccharalis</i> , a broca da cana-de-açúcar	31
Referências.....	34
2. ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE <i>DIATRAEA SACCHARALIS</i> : PADRÃO DE EXPRESSÃO DO MRNA EM <i>D. saccharalis</i> DURANTE O DESENVOLVIMENTO E BUSCA POR POTENCIAIS GENES-ALVOS PARA RNAI	45
Resumo	45
Abstract	45
2.1. Introdução.....	46
2.2. Materiais e Métodos.....	48
2.2.1. Criação de insetos	48
2.2.2. Extração de RNA de <i>D. saccharalis</i> e sequenciamento de Illumina.	48
2.2.3. Processamento de dados, montagem do transcriptoma <i>de Novo</i> e anotação funcional dos transcritos.	48
2.2.4. Validação de diferenças na expressão gênica entre estágios de desenvolvimento por análise quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)	49
2.2.5. Busca de genes envolvidos com o mecanismo de RNA de interferência em <i>D. saccharalis</i> e potenciais alvos RNAi na espécie	50
2.3. Resultados e Discussão	52
2.3.1. Padrão de expressão do mRNA em <i>D. saccharalis</i> durante o desenvolvimento.....	52
2.3.2. Validação da expressão dos genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados a partir do transcriptoma de <i>D. saccharalis</i> , via RT-qPCR	55
2.3.3. Genes envolvidos no mecanismo de RNAi em <i>D. saccharalis</i>	61
2.3.4. Identificação de potenciais genes-alvos RNAi de <i>D. saccharalis</i> : estratégia visando silenciamento de genes envolvidos em rotas de hormônios e resistência a inseticidas.	64
2.3.5. Identificação de potenciais genes-alvos RNAi de <i>D. saccharalis</i> : estratégia visando emprego de método de entrega de dsRNA via alimentação.....	70

2.4. Conclusões.....	77
Referências.....	78
Anexo.....	87
3. ENTREGA DE DSRNA PARA LAGARTAS DE <i>Diatraea saccharalis</i> EMPREGANDO BACTÉRIAS <i>Escherichia coli</i> HT115 (DE3).....	91
Resumo.....	91
Abstract.....	91
3.1. Introdução.....	92
3.2. Materiais e Métodos.....	96
3.2.1. Clonagem de genes-alvo candidatos de <i>Diatraea saccharalis</i> no vetor de silenciamento pL4440.....	96
3.2.2. Verificação da produção de dsRNA por bactérias <i>E. coli</i> HT115 (DE3) transformadas.....	97
3.2.3. Otimização de parâmetros de bioensaios utilizando bactérias <i>E. coli</i> HT115 (DE3).....	98
3.2.4. Análise da ingestão das bactérias <i>E. coli</i> HT115 (DE3) transformadas pelas lagartas de <i>D. saccharalis</i> e acúmulo de dsRNA no intestino larval.....	103
3.2.5. Bioensaio de fornecimento de bactérias <i>E. coli</i> HT115 (DE3) transformadas com pL4440: <i>JHEH</i> a lagartas de <i>D. saccharalis</i>	103
3.3. Resultados e Discussão.....	104
3.3.1. Genes-alvos de <i>D. saccharalis</i> inseridos no vetor de silenciamento gênico pL4440.....	104
3.3.2. Confirmação da produção de RNA dupla-fita (dsRNA) por <i>E. coli</i> HT115 (DE3).....	113
3.3.3. Bioensaios para otimização de parâmetros.....	114
3.3.4. Ingestão e acúmulo de bactéria no intestino de lagartas de <i>D. saccharalis</i>	126
3.3.5. Bioensaio de fornecimento de bactérias <i>E. coli</i> HT115 (DE3) transformadas com pL4440: <i>JHEH</i> a lagartas de <i>D. saccharalis</i>	127
3.4. Conclusões.....	137
Referências.....	138
4. IDENTIFICAÇÃO DO GENE <i>UP56</i> DE <i>Diatraea saccharalis</i> QUE CODIFICA UMA NUCLEASE RELACIONADA À INSENSIBILIDADE À RNAi.....	147
Resumo.....	147
Abstract.....	147

4.1. Introdução.....	148
4.2. Materiais e Métodos.....	150
4.2.1. Identificação, amplificação e clonagem do gene <i>up56</i> de <i>D. saccharalis</i>	150
4.2.2. Análise filogenética do gene <i>up56</i> de <i>D. saccharalis</i>	141
4.2.3. Fornecimento de <i>dsGFP</i> para lagartas de <i>D. saccharalis</i> a fim de verificar a regulação da expressão de <i>Ds_up56</i>	153
4.2.4. Síntese de cDNA das amostras do experimento de fornecimento de <i>dsGFP</i> para lagartas de <i>D. saccharalis</i> para verificar a expressão de <i>Ds_up56</i>	155
4.2.5. Análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) do gene <i>Ds_up56</i> após ingestão de <i>dsGFP</i> por lagartas de <i>D. saccharalis</i>	156
4.2.6. Determinação da expressão basal de <i>Ds_up56</i> : Coleta de ovos e de lagartas do 1º ao 6º instar larval de <i>D. saccharalis</i>	156
4.2.7. Determinação da expressão basal de <i>Ds_up56</i> : Extração de RNA e síntese de cDNA a partir dos ovos e lagartas coletadas de <i>D. saccharalis</i>	158
4.2.8. Amplificação e clonagem de fragmento do gene <i>Ds_up56</i> para produção de dsRNA.....	159
4.2.9. Clonagem de <i>Ds_up56</i> em vetor de silenciamento pL4440 e transformação em <i>Escherichia coli</i> HT115 (DE3)	160
4.2.10. Fornecimento de <i>dsDs_up56</i> a lagartas de <i>D. saccharalis</i>	161
4.2.11. Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão gênica	162
4.3. Resultados e Discussão.....	162
4.3.1. Identificação e análise filogenética da REase em <i>D. saccharalis</i> : uma nuclease específica que suprime o RNAi.....	162
4.3.2. Identificação do gene <i>up56</i> de <i>D. saccharalis</i> (<i>Ds_up56</i>): BLAST contra o transcriptoma do inseto	165
4.3.3. Análise de expressão do gene <i>Ds_up56</i> em lagartas de <i>D. saccharalis</i> após ingestão de <i>dsGFP</i> por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR).....	174
4.3.4. Obtenção de fragmento do gene <i>Ds_up56</i> para produção de dsRNA	177
4.3.5. Influência do <i>knockdown</i> da REase de <i>D. saccharalis</i> na resposta RNAi do inseto	179
4.4. Conclusões.....	186
Referências.....	187
Anexo	193

5. O ENDOFÍTICO <i>Pantoea agglomerans</i> 33.1 COMO VETOR DE ENTREGA DE DSRNA PARA CONTROLE DE PRAGAS DE INSETOS-PRAGA POR RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAI)	195
Resumo.....	195
Abstract	195
5.1. Introdução.....	196
5.2. Materiais e Métodos.....	200
5.2.1. Amplificação do 16S rRNA de <i>P. agglomerans</i> 33.1	200
5.2.2. Análise filogenética de <i>P. agglomerans</i> 33.1	201
5.2.3. Amplificação do gene <i>rnc</i> de <i>P. agglomerans</i> 33.1, clonagem em pGEM-T Easy e caracterização estrutural e funcional da proteína RNaseIII.	202
5.2.4. <i>Knockout</i> do gene <i>rnc</i> de <i>P. agglomerans</i> 33.1 utilizando a técnica de recombinação λ -red	204
5.2.5. Ensaio de cinética de crescimento de <i>P. agglomerans</i> 33.1 nocauteada	207
5.2.6. Obtenção de <i>P. agglomerans</i> 33.1 nocauteada com vetor pCM88.....	208
5.2.7. Avaliação da capacidade de colonização endofítica de <i>P. agglomerans</i> 33.1 Δ <i>rnc</i> em plântulas de cana-de-açúcar - Microscopia Confocal	208
5.2.8. Avaliação da capacidade de colonização endofítica de <i>P. agglomerans</i> 33.1 Δ <i>rnc</i> em plântulas de cana-de-açúcar - Isolamento do microrganismo a partir do hospedeiro vegetal.....	209
5.2.9. Avaliação da capacidade de promoção do crescimento vegetal de <i>P. agglomerans</i> 33.1 Δ <i>rnc</i> em plântulas de cana-de-açúcar.	211
5.2.10. Transformação de <i>P. agglomerans</i> 33.1 Δ <i>rnc</i> com vetor para expressão de dsRNA	211
5.2.11. Extração de dsRNA de <i>P. agglomerans</i> 33.1 Δ <i>rnc</i>	212
5.2.12. Transformação de <i>P. agglomerans</i> 33.1 Δ <i>rnc</i> com vetor para expressar dsRNA contra um gene-alvo do inseto: obtendo o vetor.....	213
5.2.13. Geração da construção pdag: <i>Ds_up56</i>	213
5.2.14. Transformação de <i>P. agglomerans</i> 33.1 Δ <i>rnc</i> com vetor para expressar dsRNA contra um gene-alvo do inseto: ligação do inserto ao vetor.....	214
5.2.15. Extração de ds <i>Ds_up56</i> de <i>P. agglomerans</i> 33.1 Δ <i>rnc</i>	215
5.3. Resultados e Discussão	215
5.3.1. Identificação e análise filogenética da cepa bacteriana <i>P. agglomerans</i> 33.1.....	215

5.3.2. Caracterização e anotação funcional da RNaseIII de <i>P. agglomerans</i> 33.1 (Pa-RNaseIII) por análise genômica comparativa.....	217
5.3.3. <i>P. agglomerans</i> 33.1 com o gene <i>rnc</i> nocauteado.	223
5.3.4. Curva de crescimento de <i>P. agglomerans</i> 33.1 nocauteada	229
5.3.5. Detecção da colonização endofítica de <i>P. agglomerans</i> 33.1 Δ <i>rnc</i> em plântulas de cana-de-açúcar por microscopia Confocal.....	230
5.3.6. Isolamento de <i>P. agglomerans</i> 33.1 Δ <i>rnc</i> a partir de plântulas de cana-de-açúcar inoculadas	233
5.3.7. Promoção do crescimento vegetal de <i>P. agglomerans</i> 33.1 Δ <i>rnc</i> em plântulas de cana-de-açúcar.....	236
5.3.8. Produção e acúmulo de dsRNA por <i>P. agglomerans</i> 33.1 Δ <i>rnc</i>	239
5.3.9. Produção e acúmulo de dsRNA contra gene-alvo específico do inseto por <i>P. agglomerans</i> 33.1 Δ <i>rnc</i>	240
5.4. Conclusões.....	245
Referências.....	246

RESUMO

Silenciamento gênico de *Diatraea saccharalis* utilizando a técnica de RNA de interferência (RNAi)

O uso da técnica de RNAi vem sendo apontado como uma estratégia inovadora que pode ser integrada no manejo de importantes pragas agrícolas. *Diatraea saccharalis* é considerada uma das principais pragas da cana-de-açúcar. Os danos econômicos gerados à cultura são bastante consideráveis. A cada safra, R\$ 5 bilhões são perdidos no Brasil em decorrência do ataque desta praga. A junção destes fatores implica, portanto, numa demanda por outros métodos de controle. O silenciamento gênico por RNAi surge como potencial de uso para o controle de *D. saccharalis*. Logo, o objetivo do trabalho foi avaliar o transcriptoma de *D. saccharalis* e identificar os relacionados a maquinaria de RNAi nesta espécie, bem como potenciais genes alvos para silenciamento gênico. Além disso, avaliar o silenciamento de genes de *D. saccharalis*, utilizando o método de entrega de dsRNA via bactéria *E. coli* HT115 (DE3), disponibilizada em dieta artificial. Ainda, buscou-se realizar a identificação, caracterização e *knockdown* do gene relacionado a uma proteína de degradação de dsRNA em insetos, principalmente lepidópteros, a REase de *D. saccharalis*, objetivando maior acúmulo de dsRNA e melhor eficiência RNAi no inseto. Também, estudou-se a criação de um método de entrega de dsRNA para lagartas de *D. saccharalis* via bactérias endofíticas *Pantoea agglomerans* 33.1. Para isto, foi necessário realizar primeiramente o *knockout* do gene *rnc* do microrganismo, e posterior transformação para expressão de dsRNA. No geral, foram encontrados *contigs* homólogos de todos os componentes da rota de RNAi. Além disso, genes envolvidos em rotas de hormônios, resistência a inseticidas e ao trato digestório do inseto foram identificados como candidatos ao silenciamento gênico via RNAi. A partir da avaliação dos parâmetros biológicos (duração da fase larval, mortalidade larval e peso de pupas), pudemos demonstrar com a entrega de dsRNA contra genes alvos específicos do inseto, expressos em bactérias *E. coli* HT115 (DE3), a ausência de evidências de efeitos de silenciamento gênico, presumindo-se que, tal como ocorre na maioria dos insetos da ordem Lepidoptera, *D. saccharalis* apresenta recalcitrância aos mecanismos de RNAi. Além disso, a identificação e o *knockdown* do gene *Ds_up56*, que codifica REase em *D. saccharalis*, reduziu em 3,5 vezes o acúmulo de transcritos de *CHI* demonstrando a contribuição deste gene para a degradação de transcritos do gene alvo e aumentando a eficiência RNAi, justificando a recalcitrância de *D. saccharalis* ao RNAi. Por fim, com o *knockout* do gene *rnc* de *P. agglomerans* 33.1 e com a transformação deste microrganismo com vetor de silenciamento pdag para expressar dsRNA contra um gene específico de *D. saccharalis*, demonstramos a ocorrência de acúmulo de dsRNA no hospedeiro bacteriano, propondo a utilização de *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* como vetor de entrega RNAi para o controle de insetos-praga, demonstrando ser uma alternativa potencial para a proteção de culturas agrônomicas relevantes.

Palavras-chave: Bactérias, Insetos-praga, RNA de interferência, Silenciamento pós-transcricional

ABSTRACT

Gene silencing of *Diatraea saccharalis* using an RNA interference (RNAi) technique

The RNAi technique is an innovative strategy that can be integrated into managing critical agricultural pests. *Diatraea saccharalis* is considered one of the main pests of sugarcane. The economic damage to the culture is quite considerable, generating R\$ 5 billion of losses occur in Brazil due to the attack of this pest each season. Combining these factors implies, therefore, a demand for other control methods. Gene silencing by RNAi is a potential use for the control of *D. saccharalis*. Therefore, this work aimed to evaluate the transcriptome of *D. saccharalis* and identify the RNAi machinery related in this species, as well as potential target genes for gene silencing. In addition, to evaluate the silencing of *D. saccharalis* genes, the method of dsRNA delivery via the bacterium *E. coli* HT115 (DE3) was provided in an artificial diet. Furthermore, we looked to identify, characterize, and knockdown the gene related to a dsRNA degradation protein in insects, mainly lepidopterans, the REase of *D. saccharalis*, aiming at a more significant accumulation of dsRNA and better RNAi efficiency in the insect. Also, the creation of a dsRNA delivery method for *D. saccharalis* larvae via endophytic bacteria *Pantoea agglomerans* 33.1 was studied. For this, it was necessary first to perform the knockout of the *rnc* gene of the microorganism and subsequent transformation for expression of dsRNA. Overall, homologous contigs of all components of the RNAi pathway were found. In addition, genes involved in hormone pathways, insecticide resistance, and insect digestive tract were identified as candidates for gene silencing via RNAi. From the evaluation of biological parameters (duration of the larval stage, larval mortality, and pupae weight), we were able to demonstrate, with the delivery of dsRNA against specific target genes of the insect, expressed in *E. coli* HT115 (DE3) bacteria, the absence of evidence of gene silencing effects. Assuming that, as in most insects of the order Lepidoptera, *D. saccharalis* shows recalcitrance to RNAi mechanisms. In addition, the identification and knockdown of the *Ds_up56* gene, which encodes REase in *D. saccharalis*, reduced the accumulation of *CHI* transcripts by 3.5 times, demonstrating the contribution of this gene to the degradation of transcripts of the target gene and increasing RNAi efficiency and justifying the recalcitrance of *D. saccharalis* to RNAi. Finally, with the knockout of the *rnc* gene of *P. agglomerans* 33.1 and the transformation of this microorganism with a pdag silencing vector to express dsRNA against a specific gene of *D. saccharalis*, it was demonstrated that the occurrence of dsRNA accumulation in the bacterial host, proposing the use of *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* as an RNAi delivery vector for insect pest control, proving to be a potential alternative for protection of relevant crops.

Keywords: Bacteria, Insect pests, Post-transcriptional silencing, RNA interference

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. O mecanismo de RNA de interferência (RNAi) e seu funcionamento em insetos

Em 1998, Andrew Fire e Craig Mello publicaram um trabalho relatando que a introdução de um RNA de fita dupla específico do gene alvo (dsRNA) no nematódeo *Caenorhabditis elegans* levou a um *knockdown* eficiente da expressão gênica (Fire *et al.*, 1998). Embora os efeitos de RNAi já tivessem sido observados muito antes em organismos como plantas, fungos e *C. elegans*, esta foi a primeira vez que se pode provar que o dsRNA era o gatilho das resposta de silenciamento (Montgomery, 2004). Nos anos seguintes, as diversas vias relacionadas ao RNAi foram elucidadas em nematoides (Tabara *et al.*, 1999; Sijen *et al.*, 2001; Parrish & Fire, 2001; Alcazar *et al.*, 2008; Winston *et al.*, 2002; Feinberg & Hunter, 2003; Winston *et al.*, 2007; Hinas *et al.*, 2012). Também rapidamente se tornou aparente que essas vias de regulação gênica pós-transcricional eram conservadas evolutivamente em todos os eucariotos e estavam envolvidas em vários processos, incluindo defesa antiviral (pequena via de interferência de RNA ou siRNA - *small interfering RNA*), regulação gênica interna (via de microRNA ou miRNA) e proteção do genoma contra transposons (RNA de interação com piwi ou via piRNA) (Tuschl, *et al.*, 1999; Lee & Ambros, 2001; Schott *et al.*, 2005; Nishida *et al.*, 2007). Em insetos, essas três vias operam em grande parte por meio de proteínas efetoras distintas, embora alguma interação entre as vias seja sugerida (Yang *et al.*, 2020). Dicer, Argonata (Argo) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) são os elementos fundamentais envolvidos no processo de RNAi (Dang *et al.*, 2011).

Os siRNAs são produzidos endogenamente; entretanto, dsRNAs exógenos também podem ser entregues a células de insetos e, então, processados em pequenos duplexes sob a ação de ribonucleases-III (Dicer) (Zhang *et al.*, 2004) (Figura 1). No citoplasma, os siRNAs formam um complexo com proteínas de ligação ao RNA, membros da família Argonata (Ago), levando ao estabelecimento do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (Lee *et al.*, 2006). A estrutura montada contém essencialmente o siRNA e Ago-2 que possui uma atividade de clivagem catalítica. A estrutura montada é ativada pela descarga da fita de RNA passageiro e então se move com a única fita de RNA guia em direção ao reconhecimento do alvo por complementariedade de bases (Kim & Rossi, 2008). O reconhecimento do alvo leva ao silenciamento transcricional ou pós-transcricional do gene (Liu *et al.*, 2020) (Figura 1).

Por sua vez, os miRNAs são pequenos RNAs que não codificam proteínas. Eles atuam no controle da expressão de genes nas células. Mais de 2.000 sequências regulatórias são reconhecidas (Hammond, 2015). O miRNA primário (pri-miRNA) é processado sob a ação de Drosha e Pasha para posteriormente moldar o precursor do pre-miRNA (Figura 1). Este último forma o duplex de miRNA após sua clivagem pela Dicer. O duplex de miRNA é processado em um miRNA de fita simples por uma RNA-helicase. O miRNA maduro é carregado por Argo para formar o RISC. O silenciamento pós-transcricional de genes é realizado pela Argo que direciona o miRNA para os mRNAs alvos. Neste caso, o *knockdown* é induzido por repressão traducional ou degradação de mRNA (Bagga *et al.*, 2005; Pong & Gullerova, 2018; Zhu & Palli, 2020) (Figura 1).

Em relação à via do piwi (piRNA), a partir de *clusters* de piRNA, a RNA polimerase II transcreve um longo RNA antisenso de fita simples (Figura 1). O RNA produzido é um precursor de pre-piRNA que será posteriormente transformado em piRNA primário (pri-piRNA) sob a ação de uma endonuclease (Zuc). O piRNA é então carregado em proteínas específicas para produzir o complexo Piwi, que degrada o alvo e gera novos piRNAs senso. Os novos piRNAs são carregados outra vez à Argo-3. As sequências correspondentes são clivadas com a síntese de novos piRNAs antisenso, e o ciclo começa novamente (Zhu & Palli, 2020).

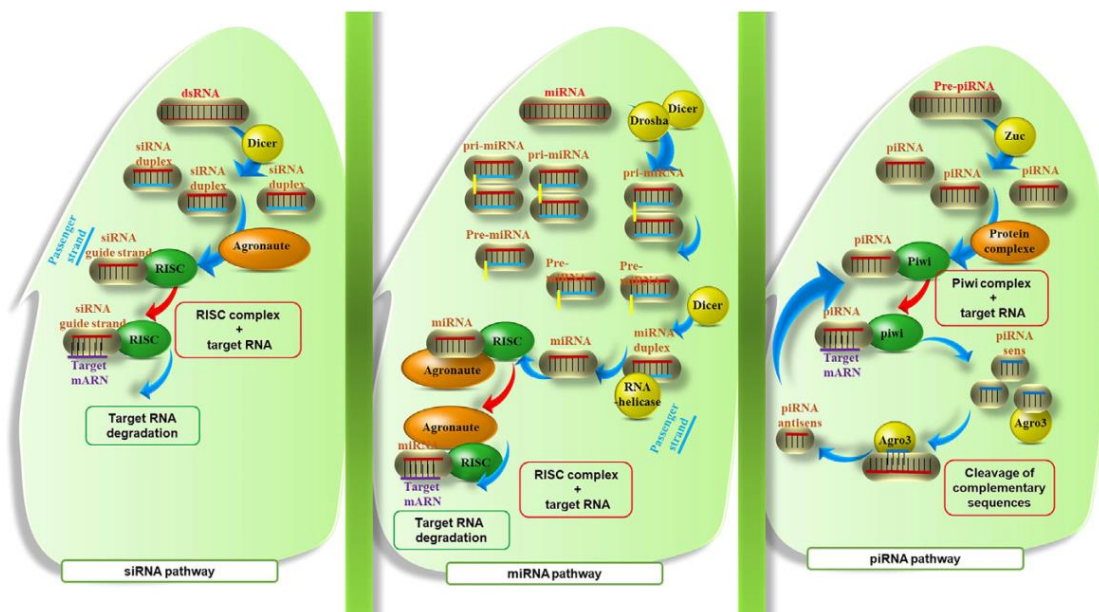


Figura 1. Regulação gênica em células de insetos via siRNA, miRNA e piRNA. Fonte: Gacem *et al.*, (2021).

Enquanto a via de siRNA evoluiu para lidar com dsRNA viral na célula, levando ao silenciamento de genes virais cruciais, passou-se a explorar esse sistema para introduzir dsRNA exógeno visando o silenciamento de um gene endógeno na célula (Cooper *et al.*, 2019). Em 2007, dois estudos forneceram uma prova de conceito de que o RNAi poderia ser um método de controle de pragas (Baum *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2007). A estratégia aqui seria silenciar efetivamente genes essenciais em um organismo praga, levando à morte ou incapacidade da praga por meio do fornecimento de moléculas de dsRNA referente a uma gene-alvo essencial (Cooper *et al.*, 2019).

A captação destas moléculas de dsRNA fornecidas, pelas células do inseto pode ocorrer de duas formas: por meio do RNAi autônomo e não autônomo (Huvenne & Smagghe, 2010). No caso do RNAi autônomo, o silenciamento ocorre apenas nos tecidos em que o dsRNA foi introduzido, tornando a eficiência limitada. Por outro lado, no caso de RNAi não autônomo, o efeito de silenciamento também é observado em outros locais além do local de aplicação do dsRNA. O mecanismo de RNAi celular não autônomo envolve dois tipos de processos: o ambiental (*environmental*) e o sistêmico (*systemic*) (Figura 2) (Huvenne & Smagghe, 2010). O RNAi ambiental compreende todos os processos nos quais o dsRNA é absorvido por uma célula a partir do ambiente. Já o RNAi sistêmico inclui processos nos quais um sinal de silenciamento é transportado de uma célula para outra ou de um tipo de tecido para outro, havendo silenciamento gênico nestes novos locais (Huvenne & Smagghe, 2010; Joga *et al.*, 2016). Para que o inseto internalize o dsRNA de um gene-alvo de silenciamento, esse terá que ser absorvido pela(s) célula(s), e por vezes, transportado de uma célula para outra ou de um tecido para outro, de forma sistêmica (Huvenne & Smagghe, 2010) (Figura 2). Em insetos, o RNAi celular não autônomo tem sido amplamente explorado de forma que a internalização do dsRNA é feita através da alimentação direta (ingestão). O silenciamento é obtido quando o dsRNA é absorvido pelas células intestinais a partir do lúmen intestinal. Depois disso, o dsRNA é expresso em células além do intestino, permitindo a propagação do sinal de silenciamento (Huvenne & Smaghe, 2010; Nitnavare *et al.*, 2021).

SID-1 e *SID-2* (*systemic RNAi defective*) são proteínas conhecidas por coordenar o transporte de dsRNA (Winston *et al.*, 2007). Em *C. elegans*, *SID-2* desempenha um papel essencial na captação do dsRNA ambiental, não atuando na disseminação de RNAi entre as células; enquanto *SID-1* é uma componente chave para o RNAi sistêmico (Winston *et al.*, 2002). Nos insetos, duas vias de absorção de dsRNA pelas células foram descritas: por meio do canal da proteína de membrana (*SID*) e pela via de endocitose (Joga *et al.*, 2016). Enquanto a proteína *SID-2* importa dsRNA do lúmen intestinal através da endocitose, a

exportação dos dsRNAs para células vizinhas ocorre através de canais SID-1 por meio de movimento passivo (Whangbo & Hunter, 2008; McEwan *et al.*, 2012). Proteínas do tipo SID-1 (SID-like ou SIL) foram relatadas na maioria das espécies de insetos; no entanto, até agora, proteínas semelhantes a SID-2 parecem estar ausentes em insetos (Joga *et al.*, 2016). Não está claro se os homólogos SID / SIL contribuem para a absorção de dsRNA em todos os insetos, já que estas proteínas parecem estar completamente ausentes em Diptera (Fishilevich *et al.*, 2016), sugerindo que os mecanismos moleculares relacionados com processo de absorção de dsRNA pelas células podem ocorrer de acordo com a espécie e a ordem dos insetos (Roignant *et al.*, 2003; Tomoyasu *et al.*, 2008). Alguns relatos sugerem que a resposta RNAi não é dependente de proteínas SID ou SIL em espécies das ordens Orthoptera e Lepidoptera (Luo *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). No entanto, isso não implica que a função das proteínas SID para a absorção e disseminação sistêmica de RNAi possa ser descartada completamente nesses insetos (Fishilevich *et al.*, 2016).

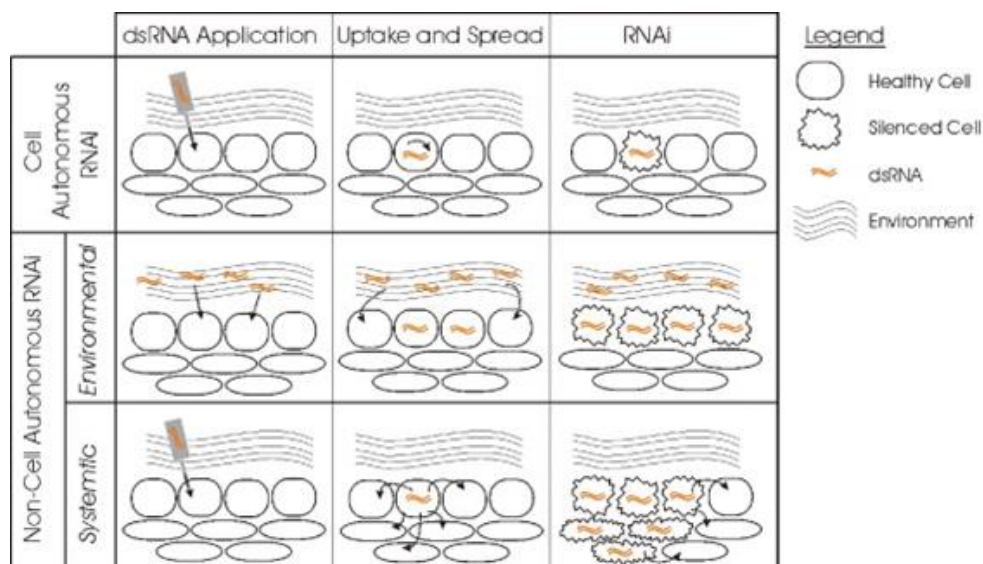


Figura 2. Mecanismo de RNAi celular autônomo e não autônomo (sistêmico e ambiental). Fonte: Huvenne & Smaghe (2010).

A maior parte dos trabalhos sobre a disseminação sistêmica de RNAi sugere que não existe um mecanismo de amplificação de RNAi em insetos (Cooper *et al.*, 2019). Em *C. elegans*, siRNAs secundários são sintetizados por uma RNA-polimerase dependente de RNA (RdRP), que amplifica o sinal silenciador. No entanto, nenhum homólogo canônico para esta RdRP foi descoberto em insetos até o momento (Joga *et al.*, 2016). Em *Drosophila melanogaster*, evidências de um mecanismo de amplificação RNAi foi relatado a partir de estudos de imunidade viral (Tassetto *et al.*, 2017). Experimentos utilizando um inibidor da

transcriptase reversa demonstraram que o RNA viral é convertido em vDNA pela transcriptase reversa endógena, que é então usada como molde para sintetizar siRNAs para iniciação imune. Este é o primeiro relato acerca da existência de um mecanismo de amplificação de RNAi observado em insetos. A ressalva, entretanto, é que esse mecanismo de amplificação é estimulado apenas em resposta a infecções virais e, na ausência de uma infecção viral, o dsRNA exógeno é convertido apenas em siRNA primário, não em siRNAs secundários, sugerindo que a aplicação de dsRNA exógeno por si só pode não induzir totalmente a resposta imune necessária que inicia o RNAi sistêmico em insetos (Tassetto *et al.*, 2017).

De qualquer maneira, os vários mecanismos envolvidos no RNAi têm sido investigados em uma ampla gama de classes/ordens de insetos, como Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera e Isoptera quanto à extensão da capacidade de silenciamento do mRNA (Huvenne & Smaghe, 2010; Singh *et al.*, 2017; Nitnavare *et al.*, 2021).

1.2. Aplicação do RNA de interferência (RNAi) para controle de insetos-praga

O uso em larga escala de pesticidas químicos cria uma grande pressão ecológica no solo, na água, no ar e na biodiversidade (Tudi *et al.*, 2021). Após o uso prolongado de pesticidas, os problemas de resistência, ressurgimento e resíduos ('3R') tornaram-se cada vez mais proeminentes (Tudi *et al.*, 2021). Várias desvantagens dos pesticidas químicos convencionais tornam-se aparentes. Por exemplo, devido ao seu amplo espectro de ação, os pesticidas podem impor um impacto negativo em insetos benéficos, como polinizadores e joaninhas predadoras, e isso representa uma ameaça para a biodiversidade (Tudi *et al.*, 2021). Em geral, os pesticidas químicos sintéticos são lentos para se decompor no ambiente natural e, portanto, há preocupações sobre a saúde dos ecossistemas devido ao acúmulo de pesticidas residuais. O uso de quantidades extremamente altas de pesticidas ao longo do tempo tem levado ao surgimento de pragas com resistência adquirida aos produtos químicos (Hashiro & Yasueda, 2022). Além disso, os princípios ativos dos pesticidas requerem ser continuamente desenvolvidos, e, portanto, os novos pesticidas sintéticos inovadores com novas estruturas químicas não são mais tão fáceis de se obter quanto costumava ser (Hashiro & Yasueda, 2022).

Diante deste cenário, uma das alternativas tecnológicas que surgiram mais recentemente são os pesticidas à base de RNAi (Zhu & Palli, 2020). Nessa tecnologia, o RNA de fita dupla (dsRNA) é entregue sob algum formato a um organismo alvo, penetrando no

hospedeiro e desencadeia o efeito de RNAi – a expressão do gene alvo complementar ao dsRNA é silenciada, o que pode afetar o crescimento, desenvolvimento e a viabilidade do organismo alvo, alcançando assim o controle de pragas (Fire *et al.*, 1998; Fletcher *et al.*, 2020; Zhu & Palli, 2020). Os pesticidas de RNAi são considerados inovadores e ecologicamente mais adequados por serem mais específicos, inerentemente não tóxicos e o agente pesticida é facilmente degradado (Guan *et al.*, 2021).

Os biopesticidas à base de RNAi são dsRNAs com sequências homólogas a regiões de genes alvo de insetos e cuja atividade é resultado do efeito silenciador de mRNAs específicos no organismo alvo (Li *et al.*, 2022). Os genes essenciais para o crescimento e desenvolvimento de pragas podem estar sozinhos ou em combinação, e podem ser potenciais genes alvo no desenvolvimento de pesticidas baseados em RNAi, proporcionando uma vantagem significativa sobre os químicos (Li *et al.*, 2022). Cerca de 25% a 35% do genoma de insetos representam genes essenciais, que podem ser potenciais candidatos como alvos para RNAi (Dietzl *et al.*, 2007). A ampla gama de alvos disponíveis para pesticidas à base de RNAi torna o custo inicial de desenvolvimento relativamente baixo. Nos EUA, o desenvolvimento de um pesticida químico convencional leva pelo menos 12 anos até a sua entrada no mercado, custando em média US\$ 280 milhões. Já uma cultivar transgênica convencional pode estar em desenvolvimento por uma média de 13 anos, com custos de investimento de US\$ 130 a US\$ 140 milhões. Em contraste, o desenvolvimento de biopesticidas baseados em RNAi requer apenas investimento de US\$ 3 a 7 milhões e pode ser concluído em aproximadamente 4 anos (Marrone, 2014; Marrone, 2019). Portanto, pesticidas à base de RNAi apresentam boa perspectiva e aplicação no controle de pragas.

Os métodos atuais para a produção de dsRNA incluem transcrição *in vitro*, síntese química e fermentação microbiana. Relatos recentes sugerem que cerca de 2 a 10 g de dsRNA podem ser necessários por hectare (Zotti *et al.*, 2018). As abordagens de síntese química e de transcrição *in vitro* podem alcançar a produção de dsRNA em escala industrial devido à sua relativa facilidade de escala (Nwokeoji *et al.*, 2022). No entanto, os altos custos associados a esses métodos são insustentáveis, especialmente para aplicações agrícolas. As vantagens da síntese química são o grande rendimento de dsRNA de alta pureza e uma gama mais ampla de modificações disponíveis do que outros métodos (Amarzguioui *et al.*, 2005; Tenllado *et al.*, 2003). As desvantagens incluem o custo e os tempos de resposta (geralmente 4 a 12 dias, dependendo das opções de síntese e purificação). O *kit* de transcrição *in vitro* (IVT) é mais acessível do que seu equivalente de síntese química, com o MEGAscript™ permitindo a produção de 1 g ao custo de US\$ 3.000 em poucas horas. Embora o IVT seja eficiente, os

custos de produção são limitantes, especialmente para aplicações de controle de pragas (Nwokeoji *et al.*, 2022). A produção microbiana, por outro lado, promete ser mais barata, com custos-alvo projetados em cerca de US\$ 4 por grama. Para conseguir isso e tornar o preço comercialmente viável, são necessárias inovações no processo de síntese dsRNA microbiano, incluindo procedimentos de produção e purificação, para maximizar o rendimento e a qualidade do dsRNA (Nwokeoji *et al.*, 2022).

Um sistema microbiano utilizado usualmente para a produção de dsRNA é a cepa bacteriana HT115 (DE3) (Takiff *et al.*, 1989) de *Escherichia coli*, uma cepa deficiente em RNase III. A RNase III degrada o dsRNA em *E. coli*, e sua ausência permite que o dsRNA se acumule no citoplasma. Esta cepa é derivada da BL21 (DE3) e, como tal, expressa o gene da RNA polimerase do bacteriófago T7 a partir de um promotor indutível (*lac*). Portanto, o dsRNA pode ser superexpresso na cepa HT115 de maneira semelhante à superexpressão de proteína recombinante microbiana quando transformada com plasmídeos de expressão contendo sequências promotoras de T7. A capacidade de realizar fermentação em larga escala para a produção de dsRNA aumenta a possibilidade de alimentar os insetos diretamente com as bactérias que expressam dsRNA ou aplicar bactérias induzidas em culturas para aplicações no controle de pragas. (Goodfellow *et al.*, 2019; Kunte *et al.*, 2020; Timmons *et al.*, 2001). Outra vantagem é o fato de os insetos ingerirem o dsRNA protegido pelas células bacterianas, o que os tornam menos suscetíveis a degradação no trato digestório dos insetos. Estudos recentes nos gêneros de pragas de lepidópteros *Spodoptera* e *Helicoverpa* demonstram a eficácia dessa abordagem (Vatanparast *et al.*, 2021; Wan *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). A aplicação de inseticidas dsRNA via pulverização direta do material de fermentação microbiana (expressando o dsRNA) tem desvantagens potenciais relacionadas à própria pulverização da cultura, bem como desafios e custos da formulação (Nwokeoji *et al.*, 2022).

Uma abordagem alternativa é extrair e purificar o dsRNA da fermentação antes da formulação e entrega do dsRNA à cultura. Os benefícios potenciais incluem atividade de RNAi aprimorada do ingrediente ativo, custo de formulação reduzido, entrega aprimorada de ingrediente ativo e caracterização e quantificação aprimoradas do ingrediente ativo (Nwokeoji *et al.*, 2022). A administração de dsRNA extraído de HT115 (DE3) induzida já demonstrou ser capaz de ocasionar *knockdown* em uma espécie de lepidóptero (Wan *et al.*, 2021), porém, o dsRNA fica mais sujeito a degradação ambiental.

Embora o RNAi tenha sido usado anteriormente como uma ferramenta para examinar a função gênica em insetos (Belles, 2010), Baum *et al.* demonstraram a abordagem de RNAi aplicada a insetos por ingestão (através de dieta artificial ou milho transgênico) para induzir a

mortalidade na lagarta da raiz do milho (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) através do direcionamento de dsRNA de várias subunidades da V-ATPase, juntamente com α -tubulina (Baum *et al.*, 2007). Mao *et al.* (2007) relataram o comprometimento do crescimento da lagarta do algodão (*Helicoverpa armigera*) pela alimentação de material foliar vegetal expressando um dsRNA específico para um gene do citocromo P450 (Mao *et al.*, 2007). A aprovação das primeiras cultivares comerciais OGMs expressando dsRNA contra um inseto praga ocorreu em 2017, com o milho SMARTSTAX PRO da Monsanto e Dow, incorporando um dsRNA contra outro gene da lagarta do milho, *Snf7* (Head *et al.*, 2017). Na mesma época, foi concedida a aprovação para as culturas de maçã e batata para regulação da expressão de genes endógenos para melhoria da qualidade através da expressão de dsRNAs (Waltz, 2015; Baranski *et al.*, 2019).

Houve um salto recente nesta tecnologia para o manejo de pragas e ajudou a encontrar possíveis soluções para situações globais de pragas emergentes (Nitnavare *et al.*, 2021). O uso de plantas transgênicas expressando dsRNA é uma estratégia desejável para atingir o efeito apropriado. No entanto, estruturas regulatórias limitaram a aplicação dessa tecnologia, bem como a baixa aceitação pública em muitos mercados e a incapacidade de transformar geneticamente muitas espécies (Zotti *et al.*, 2018). Consequentemente, grande parte do foco recente no RNAi para proteção de cultivos tem buscado estratégias não transformadoras (Dalakouras *et al.*, 2019). dsRNA associados a nanopartículas, pulverização foliar, encharcamento de raízes, injeção de caule e RNAi mediado por microrganismos são algumas das alternativas sendo investigadas (Nitnavare *et al.*, 2021). O RNAi através da alimentação tem grande potencial como técnica de manejo de pragas. No entanto, existem várias lacunas de conhecimento que precisam ser preenchidas antes que possa ser usado no controle de pragas, como preocupações associadas a efeitos potenciais em organismos não-alvo, destino do dsRNA no ambiente, dosagem adequada e um método de administração adequado, que precisam ser levados em consideração dependendo do agrossistema onde o dsRNA é implantado. No entanto, não há dúvida de que uma nova era de controle de insetos com base em RNAi promete novas oportunidades para o manejo de pragas eficaz e mais seletivo (Kunte *et al.*, 2020).

É evidente que o interesse comercial por compostos à base de RNA pulverizáveis na agricultura aumentou significativamente, considerando os recentes investimentos. O *pipeline* iniciado com a marca “BioDirect” da Monsanto está desenvolvendo compostos baseados em RNA para controlar insetos-praga (*Leptinotarsa decemlineata*, *Phyllotreta cruciferae*) (Taning *et al.*, 2020). A Bayer CropScience também está desenvolvendo os primeiros

produtos baseados em RNA na agricultura (Taning *et al.*, 2020). Também a Syngenta (Chem-China), que adquiriu a empresa belga Devgen, trouxe o conhecimento técnico desta última para desenvolver aplicações baseadas em RNA contra várias pragas de insetos (Syngenta, 2022).

O interesse comercial em aplicações de RNA por essas grandes empresas tem estimulado o desenvolvimento de *start-ups* que exploram ferramentas biotecnológicas existentes ou emergentes para criar as plataformas e tecnologias necessárias para o agronegócio (Taning *et al.*, 2020). Exemplos incluem tecnologias para produção em massa de dsRNA a baixo custo por empresas como *GreenLight Biosciences*, *RNAgri* (antiga APSE) e *AgroRNA* (*Genolution*). A *GreenLight Biosciences* desenvolveu com sucesso uma plataforma distinta de síntese de dsRNA livre de células (*cell-free*), totalmente escalável e a um baixo custo de US\$ 0,5/g em comparação com fermentação (US\$ 1/g), transcrição *in vitro* (US\$ 1.000/g) e síntese química (US\$ 100.000/g) (Maxwell *et al.*, 2019). O ingrediente ativo deste biopesticida, também conhecido como Ledprona, é um dsRNA longo direcionado à subunidade beta 5 do proteassoma (dsPSMB5). Em um estudo da ação do biopesticidas contra larvas de *Leptinotarsa decemlineata*, ficou comprovado que Ledprona agiu mais lentamente do que inseticidas químicos, mas reduziu os níveis de proteína alvo e forneceu proteção contra alimentação pelo inseto semelhante a um produto químico de padrão comercial, conferindo alta porcentagem de mortalidade da praga em uma ampla faixa de dose de dsRNA (Rodrigues *et al.*, 2021). A *AgroRNA* desenvolveu um outro procedimento eficaz para sintetizar dsRNA (200–800 bp) em grande quantidade, de miligrama a quilograma, por meio de uma plataforma de fermentação (<http://www.agrorna.com/>).

Uma redução significativa no preço de custo do dsRNA na última década (de US\$ 12.500/g em 2008) aumentou significativamente a viabilidade de aplicação de compostos baseados em RNA em escalas de campo de maneira econômica (Taning *et al.*, 2020). Para conseguir isso, a *start-up AgroSpheres* desenvolveu uma plataforma de biopartículas que consiste em pequenas células esféricas sem cromossomos que podem encapsular dsRNA, melhorando assim sua entrega para proteção de cultivos (<https://www.agrospheres.com/>). Esta biopartícula pode proteger a molécula de dsRNA de RNAses e da radiação UV no ambiente, que destruiria o dsRNA. A empresa *RNAissance Ag*, que em 2020 concluiu a aquisição da *startup* de biotecnologia *RNAgri*, também vem atuando no desenvolvimento de uma maneira econômica de produzir RNA para uso em produtos tópicos de RNAi, como biopesticidas (<https://www.rnaissanceag.net/>). Usando processos de fermentação em larga escala, esses dsRNAs protegidos por proteínas, e prontos para pulverizar, também são produzidos a custos

próximos a US\$ 1/g e há interesse em explorar a proteína ligada ao dsRNA para melhorar a entrega (Taning *et al.*, 2020). Em busca de alcançar a estabilidade do dsRNA contra a degradação e melhor entrega aos seus alvos, a *start-up* de biotecnologia *Nanosur* desenvolveu uma plataforma para produzir formulações de RNA modificado (MdsRNA) com melhor translocação através das membranas celulares, prevenindo a degradação rápida e, portanto, melhorando a eficácia do biopesticida baseado em RNA (<http://www.nanosur.com/>). Da mesma forma, a *start-up* *TrillumAg* desenvolveu uma nova plataforma biológica para a agricultura conhecida como *Agrisome*, onde moléculas de RNA modificadas conhecidas como MV-RNA são automontadas em nanopartículas baseadas em proteínas para melhorar a entrega e a estabilidade (<http://www.trillumag.com/>). Na última década, muitos novos veículos de entrega de nanopartículas dsRNA foram desenvolvidos, incluindo nanopartículas de copolímeros automontados e ramificados, nanopartículas inorgânicas e nanopartículas baseadas em produtos naturais, sendo que a maioria dessas soluções de entrega de dsRNA utilizam a interação eletrostática entre o fosfato aniônico do dsRNA e algum caráter catiônico presente no vetor da nanopartícula para montar um sistema capaz de proteger e transportar o dsRNA (Pugsley *et al.*, 2021).

Um novo vetor de dimensões nanométricas que consiste em camadas de nanofolhas de argila de hidróxido duplo (*layered double hydroxide* - LDH) para entrega de dsRNA também foi desenvolvido, a priori, para proteger as plantas contra infecções por vírus (Mitter *et al.*, 2017). O LDH não tóxico forma uma estrutura lamelar em camadas carregada positivamente com dsRNA (300 a 1.800 pb) adsorvido à superfície ou posicionado entre as várias partículas, formando o que tem sido chamado de formulações “BioClay” (Pugsley *et al.*, 2021). A grande vantagem desse método desta formulação consiste na proteção do dsRNA do escoamento da superfície da folha e da degradação metabólica por até 30 dias, resultando em uma proteção de longo prazo contra o alvo (Pugsley *et al.*, 2021). Essas propriedades são críticas para aplicação no campo, pois oferece preservação contra o escoamento do produto na folha e degradação enzimática do dsRNA antes da ingestão pelo inseto, contribuindo para o RNAi eficiente (Pugsley *et al.*, 2021). Experimentos *in planta* usando MgFe-LDH “BioClay” para entregar dsRNAs contra *Bemisia tabaci* demonstraram que o dsRNA aplicado topicamente não se limitou apenas às superfícies das folhas, sendo internalizado e migrando por meio dos feixes vasculares da planta. O uso de dsRNAs marcados mostrou que os dsRNAs foram absorvidos pelo inseto após a alimentação, mesmo quando este estava presente na parte inferior não pulverizada da folha. Com isso, puderam demonstrar que a formulação “BioClay”

foi efetiva no controle de *B. tabaci*, não apenas em plantas de algodão, mas também em plantas de tomateiro (Jain *et al.*, 2022).

Logo, fica claro que os produtos baseados em RNAi podem contribuir para soluções de vários problemas relacionados à produção segura e confiável de produtos agrícolas, permitindo, a realização da “agricultura sustentável” (Hashiro & Yasueda, 2022), o que já tem sido a aposta de grandes empresas envolvidas no mercado do controle de pragas agrícolas, sendo uma promessa para o futuro.

1.3. RNAi em lepidópteros

A ordem Lepidoptera representa a segunda maior ordem na classe Insecta, e inclui as principais pragas de importância agrícola (Xu *et al.* 2016). Os insetos herbívoros lepidópteros foram manejados com sucesso pelas plantas transgênicas inseticidas de primeira geração, que expressam as proteínas Bt por quase duas décadas; no entanto, relatos recentes de evolução da resistência às proteínas Bt criaram a necessidade de encontrar alternativas para o manejo dessas pragas (Alamalakala *et al.*, 2018). Conseqüentemente, os lepidópteros foram um dos primeiros e principais alvos de cultivos de RNAi. Uma revisão dos dados experimentais de RNAi em Lepidoptera revelou que o RNAi é particularmente eficaz na família Saturniidae; que genes envolvidos na imunidade são bons alvos de RNAi; que o *knockdown* da expressão gênica no tecido epidérmico parece ser o mais difícil de alcançar; e que altas doses de dsRNA são necessárias para silenciar genes por entrega oral de dsRNA (Terenius *et al.*, 2011).

No entanto, o RNAi em Lepidoptera demonstrou ser difícil de se alcançar, e uma grande variação na resposta foi observada entre as espécies (Terenius *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2016). Estudos comparativos da resposta de RNAi nos insetos Coleópteros (resposta robusta de RNAi) e Lepidópteros (resposta pobre de RNAi) realizados para entender a eficiência variável de RNAi nessas duas ordens de insetos sugerem que, apesar da captação eficiente de dsRNA pelas linhagens celulares de lepidópteros e coleópteros, o dsRNA foi degradado mais rapidamente nos Lepidópteros (Alamalakala *et al.*, 2018). Evidências experimentais mostraram que o dsRNA foi processado em siRNA em Coleoptera, mas não em Lepidoptera, sugerindo que a degradação do dsRNA (por ambiente alcalino do intestino e nucleases que degradam dsRNA), o transporte intracelular deficiente de dsRNA, a acessibilidade reduzida do dsRNA à maquinaria de RNAi (aprisionamento em endossomos) e a atividade reduzida da maquinaria de RNAi são os fatores prováveis para a baixa resposta de RNAi em lepidópteros (Shukla *et al.*, 2016).

Os primeiros experimentos de RNAi de lepidópteros foram relatados em 2002, com o *knockdown* de um gene de pigmentação em embriões de *B. mori* após a injeção de dsRNA (Quan *et al.* 2002). Diversos trabalhos publicados desde 2007, e particularmente após 2010, descreveram experimentos de RNAi bem-sucedidos em espécies de lepidópteros usando métodos clássicos e novos de entrega de dsRNA, a saber, microinjeção, alimentação, imersão, eletroporação e técnica de insetos transgênicos, bem como mediada por vírus, mediada por bactérias, e captação de dsRNA mediada por plantas (Alamalakala *et al.*, 2018).

Moléculas de dsRNA ou siRNA sintetizadas quimicamente foram usadas para demonstrar e validar funções gênicas em estudos iniciais em Lepidoptera e, posteriormente, para identificar alvos para proteção de cultivos baseada em RNAi. Em todos esses estudos, o dsRNA foi entregue aos insetos por incorporação do dsRNA na dieta artificial, por alimentação em gotículas ou por tratamento do tecido foliar antes da alimentação (Alamalakala *et al.*, 2018). O primeiro exemplo de silenciamento de genes via entrega oral de dsRNA foi relatado por Turner *et al.* (2006) em *Epiphyas postvittana*, para alcançar a supressão de vários genes alvo pela alimentação de gotículas de solução de dsRNA. Subsequentemente, o silenciamento via captação oral de dsRNA foi relatado em uma ampla gama de espécies de lepidópteros, mas o objetivo principal desses estudos não era explorar o controle ou mortalidade de insetos mediado por RNAi, mas investigar a função do gene em um processo metabólico ou de desenvolvimento por suprimir seletivamente a expressão do gene alvo (Bellés, 2010). Alguns exemplos desses estudos iniciais de RNAi mediados pela entrega oral de dsRNA incluem a regulação negativa de um citocromo P450, CYP6BG1 em *Plutella xylostella*, que reduziu a resistência larval à permetrina (Bautista *et al.*, 2009); o *knockdown* (redução de 63-64% do nível de transcrição) de um gene de quitinase específica do intestino em larvas de *Ostrinia nubilalis*, o que facilitou a compreensão da regulação do conteúdo de quitina na matriz peritrófica (Khajuria *et al.*, 2010); a supressão da expressão do gene da subunidade $\beta 1$ (β Se1) da integrina da lagarta-do-cartucho *Spodoptera exigua*, para estudar seu papel na resposta imune celular e no desenvolvimento larval (Surakasi *et al.*, 2011); e o uso de dsRNA em ensaios de alimentação para demonstrar o papel de um gene de protease de serina no processamento da proteína inseticida *Bt* Cry1Ca1 em *S. exigua* (Rodriguez *et al.*, 2010). Em todos esses casos, altas concentrações de dsRNA (250 ng/ μ L) foram usadas, e uma mortalidade dependente da concentração foi relatada após o silenciamento do gene da subunidade β Se1 em *S. exigua* (Surakasi *et al.*, 2011) e do gene da subunidade vacuolar *ATPase E* em *Manduca sexta* (Whyard *et al.*, 2009). Um gene vacuolar *ATPase-A* e um gene arginina quinase (*AK*) um importante fator de regulação do

metabolismo energético em invertebrados, foram direcionados para *Tuta absoluta* (Camargo *et al.*, 2016), uma praga que é uma grande ameaça à produção comercial de tomate em todo o mundo, causando perdas de rendimento de até 100% em várias regiões (Desneux *et al.*, 2011).

Vários estudos em Lepidoptera também utilizaram dsRNA sintetizado quimicamente para suprimir a expressão de genes-alvo devido às dificuldades enfrentadas na entrega suficiente para as células epiteliais do intestino de lepidópteros (Gong *et al.*, 2011). A alimentação de siRNAs específicos para acetilcolina esterase AChE para larvas de *Helicoverpa armigera*, juntamente com a dieta artificial, resultou em um aumento de 15% na mortalidade de insetos, seguido por fenótipos como inibição do crescimento de larvas, redução do peso de pupal, malformação e menor fecundidade em comparação com as larvas de controle (Kumar *et al.*, 2009). No campo, larvas de *P. xylostella* alimentando-se de *Brassica oleracea* e *B. alboglabra* tratadas com doses de siRNA contra o gene da acetilcolina esterase AChE2 apresentaram mortalidade de 58,8% cinco dias após a exposição (Gong *et al.*, 2013). Esses estudos sugeriram que o siRNA pode ser prontamente absorvido pelas larvas de insetos com sua dieta (Baum & Roberts 2014).

A absorção de dsRNA expresso em *Escherichia coli* também foi relatada por impactar o crescimento e a sobrevivência das larvas de lepidópteros. Em *S. exigua*, o silenciamento de uma quitina sintase A por meio da alimentação alimentando as larvas com cultura bacteriana expressando dsRNA fez com que a mortalidade larval aumentasse em 14%, 21%, 26% nas larvas de primeiro instar, quarto e quinto instar larval, respectivamente (Tian *et al.*, 2009). O silenciamento do gene *CYP6B6* ao alimentar larvas com bactérias expressando dsRNA, causou um aumento de 27% na mortalidade larval em *H. armigera* (Zhang *et al.*, 2013). A redução da expressão de *AK*, ao entregar dsRNA às larvas por meio de dieta contendo bactérias expressando dsAK aumentou a mortalidade larval em *H. armigera* em 2-11% (Qi *et al.*, 2015). Jing & Han (2014) relataram a avaliação de métodos de entrega de dsRNA em *H. armigera* e concluíram que a ingestão contínua das bactérias que expressam dsRNA era mais prejudicial ao desenvolvimento e sobrevivência do inseto do que o dsRNA puro, o qual se degradava muito mais rápido no intestino médio do que na hemolinfa. O RNAi baseado na alimentação mediado por dsRNA expresso em bactérias ou sintetizado *in vitro* de um fator de transcrição regulador da muda *CiHR3* em *Chilo infuscatellus*, causou anormalidades significativas e perda de peso em insetos dentro de 7 dias de tratamento (Zhang *et al.*, 2012). Bento *et al.* (2020) demonstraram a eficácia da entrega de dsRNA bacteriano no desenvolvimento larval. O fornecimento de dsRNA direcionado aos genes *juvenile hormone*

inducible protein (JHP), *chitin synthase A (CHI)*, *carboxylesterase (COE)* e *arginine kinase (AK)* expresso por bactérias levou à uma diminuição significativa no acúmulo de transcritos e ao aumento na mortalidade larval de *T. absoluta*. O RNAi conduzido pela alimentação de larvas de *Spodoptera frugiperda* com bactérias expressando dsRNAs de genes-alvo induziu o silenciamento da *chitinase (Sf-CHI)*, *chitin synthase B (Sf-CHSB)*, *sugar transporter SWEET1 (Sf-ST)*, e *hemolin (Sf-HEM)*, resultando em efeitos negativos significativos no crescimento e sobrevivência do inseto (Wan *et al.*, 2021).

Plantas transgênicas que expressam dsRNAs específicos de insetos também têm sido usadas como alternativa para proteção de culturas agrícolas relevantes. Plantas transgênicas expressando dsRNA contra genes-alvo de *H. armigera* foram utilizadas para suprimir o desenvolvimento e a sobrevivência da praga (Xu *et al.*, 2016). A significativa supressão da expressão do gene do receptor de ecdisona (*EcR*) foi observada em larvas de *H. armigera* que se alimentaram de plantas de tabaco expressando dsRNA *EcR*, resultando em letalidade (40%) em relação ao grupo controle (10%) (Zhu *et al.*, 2012). Além disso, o crescimento das larvas alimentadas com folhas de tabaco expressando dsRNA *HaEcR* foi significativamente retardado, seus tamanhos corporais reduzidos e as larvas morreram com defeitos significativos de ecdise (Zhu *et al.*, 2012). Mortalidade elevada e aberrações de desenvolvimento foram relatadas nas larvas de *H. armigera* quando alimentadas com o mesmo tecido de tabaco transgênico, provavelmente devido à similaridade de sequência compartilhada das sequências alvo de *EcR* nessas duas espécies (Zhu *et al.*, 2012).

Xiong *et al.* (2013) relataram mortalidade larval de 22-30% e redução de massa >50% em *H. armigera* que se alimentava de discos de folhas de tabaco transgênico expressando o dsRNA de um fator de transcrição regulador da muda (*HaHR3*). Plantas de algodão transgênico expressando um dsRNA derivado do citocromo P450 CYP6AE14 induzível por gossipol não causou mortalidade em larvas de *H. armigera* que se alimentaram dos tecidos transgênicos; no entanto, as plantas mostraram maior tolerância à herbivoria do inseto (Mao *et al.*, 2011). Plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) e tomate (*Solanum lycopersicum* Mill cv. Pusa anão precoce) expressando dsRNA *CHI* de *H. armigera* foram empregadas para mostrar que a mortalidade induzida por RNAi em larvas que se alimentaram de tecido transgênico aumentou em até 45% (Reddy & Rajam 2016). A expressão transitória do dsRNA dos genes vacuolar *ATPase-A* e *AK* de *T. absoluta*, em plantas de tomate transformadas por infiltração de células de *Agrobacterium* conferiu proteção à planta contra danos causados pela alimentação de insetos e redução do acúmulo de transcrito alvo nas larvas e letalidade associada (Camargo *et al.*, 2016).

Foi determinado, ainda, que os insetos, incluindo lepidópteros, não possuem a enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRP), que atua em circuitos de amplificação de silenciamento centrados na produção de siRNA (Alamalakala *et al.*, 2018). Foi bem estabelecido também que a absorção de dsRNA em lepidópteros é limitada em comparação com outras espécies de insetos; no entanto, também foi observado que os lepidópteros são comparativamente mais suscetíveis a infecções virais (Alamalakala *et al.*, 2018). Essas infecções afetam a maquinaria de RNAi, produzindo supressores virais de RNAi que inibem a captação das moléculas de dsRNA (Swevers *et al.*, 2013). Várias linhagens celulares de lepidópteros foram estudadas para entender os processos fisiológicos subjacentes à infecção viral e seu impacto na maquinaria de RNAi. Em um desses estudos, os vírus RNA *Flock house virus* (FHV) e *Macula-like virus* (MLV) foram usados para este propósito. Em *B. mori*, *Trichoplusia ni* e *Spodoptera littoralis*, verificou-se que as linhagens celulares que não estavam infectadas com o vírus, em um ensaio repórter de RNAi, demonstraram que a formação a maquinaria de RNAi manteve-se protegida da atividade dos supressores virais (Swevers *et al.*, 2016).

O pH alcalino do intestino de lepidópteros leva à degradação do dsRNA. O RNA é mais estável entre a faixa de pH de 4-5 (ambiente ácido), sendo que qualquer variação dessa faixa pode resultar em sua hidrólise (em pH > 6,0 e <2,0) ou depurinação (<3,0), levando à sua degradação (Bernhardt & Tate 2012; Cooper *et al.*, 2019). Os lepidópteros apresentam pH do conteúdo intestinal extremamente alcalino, variando de pH 9,0 a 12,0 (Harrison, 2001), contribuindo para a degradação das moléculas de dsRNA (Cooper *et al.*, 2018). Nesse sentido, compostos protetores foram explorados para formar um complexo com dsRNA e, portanto, prevenir a degradação. Vários polímeros têm sido desenvolvidos e utilizados com a intenção de proteger as moléculas de dsRNA contra o pH fisiológico alcalino do trato digestório desta ordem de insetos, como por exemplo, os de guanidina (Christiaens *et al.*, 2018).

A fim de explorar outros fatores que afetam a eficiência do RNAi, Shukla *et al.* (2016) estudaram os mecanismos e componentes envolvidos com a degradação do dsRNA. A acessibilidade reduzida do dsRNA à maquinaria central RNAi foi apontada como contribuinte para o RNAi ineficiente em lepidópteros (Shukla *et al.*, 2016). Essa inacessibilidade do dsRNA e sua instabilidade associada têm sido relacionadas a nucleases específicas presentes nos tecidos da espécie que não permitem a persistência do dsRNA no sistema do inseto. Um estudo com *Spodoptera litura* mostrou o papel de múltiplas dsRNases (nucleases) presentes no intestino da larva (Peng *et al.*, 2020). Quatro dessas nucleases identificadas foram capazes de degradar coletivamente o dsRNA e foram reguladas positivamente, especialmente durante

a alimentação, sendo responsáveis pela natureza refratária deste lepidóptero ao RNAi (Peng *et al.*, 2020). A nuclease relacionada à eficiência de RNAi (REase) estudada em *Ostrinia furnacalis*, codificada pelo gene *up56*, foi proposta como responsável pela natureza refratária dos lepidópteros ao RNAi (Guan *et al.*, 2018). Estudos do perfil de expressão demonstraram que na presença de dsRNA, *up56* é regulado positivamente e a diminuição da sua expressão aumenta a eficiência da maquinaria de RNAi no inseto. Além disso, REase mostrou ser um inibidor competitivo da proteína Dicer e, portanto, está diretamente relacionada com a incapacidade de processar o dsRNA em siRNA (Guan *et al.*, 2018). Homólogos desta proteína foram ainda identificados em outros lepidópteros, como *H. armigera* e *O. nubilalis* (Guan *et al.*, 2019; Cooper *et al.*, 2020), corroborando a proposição de que se trata de um gene exclusivo desta ordem (Guan *et al.*, 2018).

Com relação à expressão de mRNA de genes da maquinaria central RNAi e sua influência na eficiência RNAi desses insetos, Li *et al.* (2015) demonstraram que a superexpressão do gene de Ago2 aumentou o RNAi mediado por dsRNA em *B. mori*. A proteína Dicer de *B. mori*, BmDicer2, foi superexpressa e co-expressa com Ago2 para avaliar se ocorreria um efeito sinérgico na eficiência do RNAi. A superexpressão de BmDicer2 mostrou efeitos de silenciamento mais duradouros, mesmo em comparação com Ago2 superexpressa, sugerindo que o silenciamento era mais dependente da quantidade de siRNA, em comparação com o siRNA carregado no complexo RISC (Li *et al.*, 2015). A combinação de múltiplas estratégias pode ser uma abordagem eficiente, pois a coexpressão das duas proteínas aumentou a suscetibilidade de *B. mori* à captação de dsRNA. A expressão de Dicer2 facilitou a síntese de siRNA, enquanto Ago2 facilitou seu carregamento no complexo RISC. A complementaridade da funcionalidade das proteínas é a principal causa dos resultados acima (Li *et al.*, 2015; You *et al.*, 2020).

Ainda que a aplicação contra uma ampla gama de espécies de insetos ainda seja dificultada por vários desafios, especialmente no que diz respeito aos insetos da ordem Lepidoptera, esses desafios estão sendo abordados quanto à criação de estratégias para melhorar a persistência das moléculas de dsRNA e a absorção celular nesses insetos (Christiaens *et al.*, 2020). Pesquisas sobre o efeito de nucleases e pH fisiológico na estabilidade de dsRNA, mecanismos de captação e disseminação sistêmica de dsRNA, interação com vírus e mecanismos potenciais de resistência ajudarão a melhorar essa tecnologia no futuro (Christiaens *et al.*, 2020).

1.4. *Diatraea saccharalis*, a broca da cana-de-açúcar

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). Entre os lepidópteros, encontra-se a *D. saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), que é considerada a principal praga da cana-de-açúcar no Brasil, sendo encontrada em praticamente toda extensão cultivada da cultura, que corresponde a 8,209 milhões de hectares na safra 22/23 (CONAB, 2022). Essa espécie, dentre todas do gênero *Diatraea*, é a que apresenta a mais ampla distribuição geográfica (entre 30° N e 30° S), sendo constatada desde a região sul dos EUA, nas Antilhas e em todos os países da América Central e do Sul (Guevara, 1976).

Trata-se de uma espécie polífaga, podendo atacar pelo menos 65 espécies vegetais, e se destaca como praga de diversas culturas em vários locais, como do milho, sorgo, arroz e trigo em países como EUA, Argentina, Colômbia e México (Elias *et al.*, 1970; Marques *et al.*, 2006; Fenoglio, 2007; Huang *et al.*, 2012). A lagarta de *D. saccharalis*, conhecida como broca da cana-de-açúcar, tem coloração branco-leitosa, com manchas de coloração castanhas em todo o corpo, cápsula cefálica marrom escura, três pares de pernas torácicas e quatro pares de falsas pernas abdominais, com cerca de 25 mm (Figura 3). O adulto é uma mariposa com as asas anteriores de coloração amarelo-palha com manchas mais escuras, lembrando dois “Vs” invertidos quando fechadas, e com asas posteriores esbranquiçadas. As fêmeas são ligeiramente maiores que os machos, possuindo abdômen volumoso e asas menos pigmentadas (Botelho & Macedo, 2002).

Como membro da ordem dos lepidópteros, *D. saccharalis* possui metamorfose completa, ou seja, desenvolvimento holometabólico, passando pelos estágios de ovo, larva, pupa e adulto, sendo o estágio larval o causador dos maiores prejuízos à agricultura (Dinardo-Miranda, 2008). Seu ciclo de vida se inicia com as fêmeas adultas, que realizam a postura de seus ovos (200 a 400 ovos) de forma agrupada, tanto na face inferior como na superior do limbo foliar e, ocasionalmente, na bainha das folhas (Lima Filho & Lima, 2001). A eclosão das lagartas ocorre de quatro a nove dias, a depender da temperatura (Figura 3). Após a eclosão, a lagarta se dirige para a região do cartucho da planta à procura de abrigo e se alimenta por raspagem da folha. Depois da primeira ou segunda ecdise, as larvas iniciam a perfuração dos colmos nas regiões menos rígidas, penetram e começam a se alimentar deste tecido, dando início à abertura de galerias, geralmente no sentido ascendente, à medida que se alimenta (Botelho & Macedo, 2002). Durante o período larval, o inseto sofre de cinco a seis ecdises e completa seu desenvolvimento no interior da planta (Gallo *et al.*, 2002; Lima

Filho & Lima, 2001). Esta é a fase do desenvolvimento em que o inseto provoca danos econômicos à cultura, que dura cerca de 50 dias, podendo variar em função das condições ambientais (Dinardo-Miranda *et al.*, 2014) (Figura 3). Próximo à pupação, a lagarta abre um orifício na casca do colmo, por onde o inseto adulto emergirá, e o fecha parcialmente com fios de seda e restos de sua alimentação. Assim, protegida, a lagarta passa à fase de pupa, cuja duração é de cerca de 10 dias. Após a emergência, as mariposas têm longevidade de aproximadamente sete dias (Terán *et al.*, 1983; Botelho & Macedo, 2002). A duração total do ciclo do inseto varia entre 60 e 90 dias, dependendo de inúmeros fatores, principalmente do clima e da planta hospedeira, sendo que em temperaturas mais baixas e pouca umidade pode ocorrer alongamento do ciclo da praga, ficando a lagarta alojada no interior do colmo de cana-de-açúcar. De maneira geral, ocorrem 4 ou 5 gerações de *D. saccharalis* por ano no Brasil (Gallo *et al.*, 2002; Conte, 1994; Dossi & Conte, 2002; Beserra & Parra, 2004; Dinardo-Miranda *et al.*, 2014) (Figura 3).



Figura 3. Ciclo de vida de *Diatraea saccharalis*. Fonte: PROMIP (2022).

Os danos econômicos gerados à cultura da cana-de-açúcar são bastante consideráveis. Infestações de 1% de intensidade já são suficientes para diminuir em 1,21% a produção de cana (TCH -toneladas de colmos por hectare). A cada safra, R\$ 5 bilhões são perdidos no Brasil em decorrência do ataque de broca, sendo as perdas distribuídas entre redução da

produtividade (agrícola – 60%) e menor qualidade na extração e fermentação (indústria – 40%) (CANAOSTE, 2019).

O ataque da broca à cultura ocorre durante todo o seu desenvolvimento. Na fase larval, *D. saccharalis* provoca danos diretos e indiretos. Os danos diretos decorrem da alimentação do inseto nos tecidos da planta e se caracteriza por perda de peso, abertura de galerias, falhas na germinação, morte da gema apical, tombamento dos colmos, encurtamento do entrenó, enraizamento aéreo e germinação das gemas laterais, além do atraso da maturação que causa a redução do rendimento agrícola (Gitahy, 2006). Já os danos indiretos estão relacionados com os orifícios e galerias gerados pelo inseto, uma vez que servem como entrada e criam um ambiente propício para a proliferação de fungos que causam a doença conhecida como “podridão do colmo”. Esses microrganismos oportunistas interferem reduzindo a produção de açúcar e causando contaminação do caldo, resultando na diminuição da eficiência da levedura na fermentação alcoólica (Botelho & Macedo, 2002; Gallo *et al.*, 2002; Polanczyk *et al.*, 2004). Para cada 1% de infestação por *D. saccharalis*, as perdas chegam a 1,5% na produtividade dos colmos, 0,49% da produção de açúcar e 0,28% na produtividade do etanol (Dinardo-Miranda *et al.*, 2008).

O manejo da broca da cana-de-açúcar está baseado principalmente nos controles biológico, químico e transgenia. O controle biológico é feito por meio da liberação de parasitoides, *Trichogramma galloi*, parasitoide de ovos, e *Cotesia flavipes* que parasita as lagartas. No entanto, este método pode não ser tão eficiente, particularmente quando a predação de ovos é baixa ou em locais onde o parasitoide não se adapta (Parra & Zucchi, 2004), havendo necessidade de se combinarem outros métodos de controle. A aplicação de inseticidas, por sua vez, é mais utilizada em 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 suscetíveis e adoção da colheita mecanizada (Dinardo-Miranda, 2008). Atualmente existem 58 produtos registrados para controle de *D. saccharalis* na cana-de-açúcar, distribuídos entre os grupos químicos antranilamida, piretroide, benzoilureia, diamida, neonicotinoide, pirazol, espinosina e diacilhidrazina (AGROFIT, 2022). Porém, o controle químico é dificultado por seu hábito alimentar, já que a lagarta passa a maior parte do tempo no interior do colmo, geralmente não atingida por qualquer tipo de aplicação externa (Pereira, 2013). A adoção de inseticidas também é bastante polêmica, pois estes produtos podem afetar os inimigos naturais, que são importantes reguladores das populações de *D. saccharalis* e de demais insetos (Dinardo-Miranda, 2008).

Em 2017, a CTNBio aprovou quatro cultivares de cana-de-açúcar geneticamente modificadas desenvolvidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC): CTC20BT (CTB141175/01), CTC9001BT (CTC91087-6), CTC9003BT (CTC93209-4) e a CTC7515 (CTC75064) para cultivo e uso alimentar no país. As cultivares de elite expressam uma proteína da classe Cry1A com o objetivo de controlar a broca da cana-de-açúcar (CTNBio, 2022). No entanto, apesar de ser uma boa estratégia para o controle, sua longevidade pode ser ameaçada pelo uso da tecnologia Bt em áreas extensas e por várias safras, que exerce uma pressão de seleção sobre indivíduos naturalmente resistentes. Isso faz com que esses insetos sobrevivam e se tornem a maioria da população após algumas gerações, levando à perda de eficácia da tecnologia, assim como já foi visto para pragas das culturas de soja, milho e algodão (CIB, 2022).

A junção destes fatores implica, portanto, numa demanda por outros métodos de controle. O emprego da abordagem de RNA de interferência (RNAi), que decorre do fornecimento de RNA dupla fita (dsRNA) com a sequência de gene alvo do inseto causando o silenciamento gênico, surge, então, como potencial para controle de pragas agrícolas (Baum *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2007; Gordon & Waterhouse, 2007; Huvenne & Smagghe, 2010; Bellés, 2010; Hernández-Soto & Chacón-Cerdas, 2021; Willow *et al.*, 2021; Kaur *et al.*, 2021).

Referências

- AGROFIT. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 04 de setembro de 2022.
- Alamalakala, L., Parimi, S., Patel, N., & Char, B. (2018). Insect RNAi: integrating a new tool in the crop protection toolkit. *Trends in Insect Molecular Biology and Biotechnology*, 193-232.
- Alcazar, R. M., Lin, R., & Fire, A. Z. (2008). Transmission dynamics of heritable silencing induced by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 180, 1275-1288.
- Amarzguioui, M., Rossi, J. J., & Kim, D. (2005). Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS Letters*, 579, 5974-5981.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., & Pasquinelli, A. E. (2005). Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*, 122, 553-563.
- Baranski, R., Klimek-Chodacka, M., & Lukasiewicz, A. (2019). Approved genetically modified (GM) horticultural plants: a 25-year perspective. *Folia Horticulturae*, 31, 3-49.
- Baum, J. A., & Roberts, J. K. (2014). Progress towards RNAi-mediated insect pest management. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 47, pp. 249-295). Academic Press.
- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., ... & Roberts, J. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25, 1322-1326.

- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., ... & Roberts, J. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25, 1322-1326.
- Bautista, M. A. M., Miyata, T., Miura, K., & Tanaka, T. (2009). 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*, 39, 38-46.
- Bellés, X. (2010). Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annual Review of Entomology*, 55, 111-128.
- Bento, F. M., Marques, R. N., Campana, F. B., Demétrio, C. G., Leandro, R. A., Parra, J. R. P., & Figueira, A. (2020). Gene silencing by RNAi via oral delivery of dsRNA by bacteria in the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *Pest Management science*, 76, 287-295.
- Bernhardt, H. S., & Tate, W. P. (2012). Primordial soup or vinaigrette: did the RNA world evolve at acidic pH?. *Biology Direct*, 7, 1-12.
- Beserra, E. B., & Parra, J. R. P. (2004). Biologia e parasitismo de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner e *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera, Trichogrammatidae) em ovos de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera, Noctuidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 48, 119-126.
- Bettencourt, R., Terenius, O., & Faye, I. (2002). Hemolin gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia* pupae is lethal to next generation embryos. *Insect Molecular biology*, 11, 267-271.
- Blair, C. D., & Olson, K. E. (2015). The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. *Viruses*, 7, 820-843.
- Botelho, P. S. M., & Macedo, N. (2002). *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. *Controle Biológico no Brasil: Parasitoides e Predadores*. Manole, 409-426.
- Cai, Y., Zhou, Q., Yu, C., Wang, X., Hu, S., Yu, J., & Yu, X. (2012). Transposable-element associated small RNAs in *Bombyx mori* genome. *PloS One*, 7, e36599.
- Camargo, R. A., Barbosa, G. O., Possignolo, I. P., Peres, L. E., Lam, E., Lima, J. E., ... & Marques-Souza, H. (2016). RNA interference as a gene silencing tool to control *Tuta absoluta* in tomato (*Solanum lycopersicum*). *PeerJ*, 4, e2673.
- CANAOSTE. Broca-da-Cana: danos irreversíveis e perdas concretas da produtividade. Disponível em: <https://www.canaoeste.com.br/artigos/broca-da-cana-danos-irreversiveis-e-perdas-concretas-da-produtividade/>. Acesso em: 04 de setembro de 2022.
- Cappelle, K., de Oliveira, C. F. R., Van Eynde, B., Christiaens, O., & Smagghe, G. (2016). The involvement of clathrin-mediated endocytosis and two Sid-1-like transmembrane proteins in double-stranded RNA uptake in the Colorado potato beetle midgut. *Insect Molecular Biology*, 25, 315-323.
- Christiaens, O., Tardajos, M. G., Martinez Reyna, Z. L., Dash, M., Dubruel, P., & Smagghe, G. (2018). Increased RNAi efficacy in *Spodoptera exigua* via the formulation of dsRNA with guanylated polymers. *Frontiers in Physiology*, 9, 316.
- Christiaens, O., Whyard, S., Vélez, A. M., & Smagghe, G. (2020). Double-stranded RNA technology to control insect pests: Current status and challenges. *Frontiers in Plant Science*, 11, 451.
- CIB. Conselho de Informações sobre Biotecnologia. Impactos econômicos e socioambientais da tecnologia de resistência a insetos no Brasil: Análise Histórica, perspectivas e desafios. Disponível em: https://agroavances.com/img/publicacion_documentos/Estudo.Impactos-Bt-Brasil.pdf. Acesso em: 19 de setembro de 2022.

- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Disponível em: <https://portaldeinformacoes.conab.gov.br/safra-estimativa-de-evolucao-cana-de-acucar.html>. Acesso em 04 de setembro de 2022.
- Conte, H. (1994). Morfologia do corpo gorduroso em larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) não parasitadas e parasitadas pelo *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 160.
- Cooper, A. M., Silver, K., Zhang, J., Park, Y., & Zhu, K. Y. (2019). Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest Management Science*, 75, 18-28.
- Cooper, A. M., Song, H., Shi, X., Yu, Z., Lorenzen, M., Silver, K., ... & Zhu, K. Y. (2020). Molecular characterizations of double-stranded RNA degrading nuclease genes from *Ostrinia nubilalis*. *Insects*, 11, 652.
- Cooper, A. M., Song, H., Yu, Z., Biondi, M., Bai, J., Shi, X., ... & Zhu, K. Y. (2021). Comparison of strategies for enhancing RNA interference efficiency in *Ostrinia nubilalis*. *Pest Management Science*, 77, 635-645.
- CTNBio, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. (2022). Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br/liberacao-comercial#/liberacao-comercial/consultar-processo>. Acesso: 04 de setembro de 2022.
- Dalakouras, A., Wassenegger, M., Dadami, E., Ganopoulos, I., Pappas, M. L., & Papadopoulou, K. (2020). Genetically modified organism-free RNA interference: exogenous application of RNA molecules in plants. *Plant Physiology*, 182, 38-50.
- Dang, Y., Yang, Q., Xue, Z., & Liu, Y. (2011). RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. *Eukaryotic Cell*, 10, 1148-1155.
- Desneux, N., Luna, M. G., Guillemaud, T., & Urbaneja, A. (2011). The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *Journal of Pest Science*, 84, 403-408.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., ... & Dickson, B. J. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, 448, 151-156.
- Dinardo-Miranda, L. L., de Vasconcellos, A. C. M., & de Andrade Landell, M. G. (Eds.). (2008). Cana-de-açúcar (Vol. 1, pp. 349-404). Campinas: Instituto Agrônômico.
- Dinardo-Miranda, L. L., Fracasso, J. V., Costa, V. P. D., & Lopes, D. O. T. (2014). Dispersal of *Cotesia flavipes* in sugarcane field and implications for parasitoid releases. *Bragantia*, 73, 163-170.
- Domeier, M. E., Morse, D. P., Knight, S. W., Portereiko, M., Bass, B. L., & Mango, S. E. (2000). A link between RNA interference and nonsense-mediated decay in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 289, 1928-1930.
- Dossi, F. C. A., & Conte, H. (2002). Embriologia de *D. saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Arq. Apadec*, 6, 36.
- Jain, R. G., Fletcher, S. J., Manzie, N., Robinson, K. E., Li, P., Lu, E., ... & Mitter, N. (2022). Foliar application of clay-delivered RNA interference for whitefly control. *Nature Plants*, 8, 535-548.
- Elias, L. A. (1970). Maize resistance to stalk borers in Zeadiatraea Box and *Diatraea*. Guilding (Lepidoptera: Pyralidae) at five localities in Mexico. Kansas State University.
- Feinberg, E. H., & Hunter, C. P. (2003). Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*, 301, 1545-1547.

- Fenoglio, M. S., & Trumper, E. V. (2014). Influence of weather conditions and density of *Doru luteipes* (Dermaptera: Forficulidae) on *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) egg mortality. *Environmental Entomology*, 36, 1159-1165.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811.
- Fishilevich, E., Vélez, A. M., Storer, N. P., Li, H., Bowling, A. J., Rangasamy, M., ... & Siegfried, B. D. (2016). RNAi as a management tool for the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Pest Management Science*, 72, 1652-1663.
- Fletcher, S. J., Reeves, P. T., Hoang, B. T., & Mitter, N. (2020). A perspective on RNAi-based biopesticides. *Frontiers In plant Science*, 11, 51.
- Gacem, M. A., Boukerouis, D., Telli, A., Ould-El-Hadj-Khelil, A., & Wink, J. (2021). RNAi-based system a new tool for insects' control. In *CRISPR and RNAi Systems*. Elsevier.
- Gallo, D. O. M. I. N. G. O. S., Nakano, O. C. T. A. V. I. O., Silveira Neto, S. I. N. V. A. L., Carvalho, R. P. L., Baptista, G. C., Berti Filho, E., ... & Omoto, C. (2002). Métodos de controle de pragas. D. Gallo et al. *Entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ. 920p, 243-359.
- Gitahy, P. D. M., Galvao, P. G., SIMÕES ARAÚJO, J. L., & Baldani, J. I. (2006). Perspectivas biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis* no controle biológico da broca d cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*. *Embrapa Agrobiologia*.
- Gong, L., Chen, Y., Hu, Z., & Hu, M. (2013). Testing insecticidal activity of novel chemically synthesized siRNA against *Plutella xylostella* under laboratory and field conditions. *PLoS One*, 8, e62990.
- Gong, L., Yang, X., Zhang, B., Zhong, G., & Hu, M. (2011). Silencing of Rieske iron-sulfur protein using chemically synthesised siRNA as a potential biopesticide against *Plutella xylostella*. *Pest Management Science*, 67, 514-520.
- Goodfellow, S., Zhang, D., Wang, M. B., & Zhang, R. (2019). Bacterium-mediated RNA interference: Potential application in plant protection. *Plants*, 8, 572.
- Gordon, K. H., & Waterhouse, P. M. (2007). RNAi for insect-proof plants. *Nature Biotechnology*, 25, 1231-1232.
- Guan, R. B., Li, H. C., Fan, Y. J., Hu, S. R., Christiaens, O., Smagghe, G., & Miao, X. X. (2018). A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 6011-6021.
- Guan, R., Chu, D., Han, X., Miao, X., & Li, H. (2021). Advances in the Development of Microbial Double-Stranded RNA Production Systems for Application of RNA Interference in Agricultural Pest Control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9.
- Guevara, L. A. C. (1976). Aspectos da biologia em condições naturais e frequência de acasalamento da *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794)(Lepidoptera: crambidae) a broca da cana de acucar. *ESALQ*.
- Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, 3-14.
- Hashiro, S., & Yasueda, H. (2022). RNA Interference-Based Pesticides and Antiviral Agents: Microbial Overproduction Systems for Double-Stranded RNA for Applications in Agriculture and Aquaculture. *Applied Sciences*, 12, 2954.
- Head, G. P., Carroll, M. W., Evans, S. P., Rule, D. M., Willse, A. R., Clark, T. L., ... & Meinke, L. J. (2017). Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. *Pest Management Science*, 73, 1883-1899.

- Hernández-Soto, A., & Chacón-Cerdas, R. (2021). RNAi crop protection advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12148.
- Hinas, A., Wright, A. J., & Hunter, C. P. (2012). SID-5 is an endosome-associated protein required for efficient systemic RNAi in *C. elegans*. *Current Biology*, 22, 1938-1943.
- Hodgson, J. J., Wenger, L. W., Clem, R. J., & Passarelli, A. L. (2019). Inhibition of dicer activity in lepidopteran and dipteran cells by baculovirus-mediated expression of Flock House virus B2. *Scientific Reports*, 9, 1-12.
- Huang, F., Ghimire, M. N., Leonard, B. R., Daves, C., Levy, R., & Baldwin, J. (2012). Extended monitoring of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab maize in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *GM Crops & Food*, 3, 245-254.
- Huvenne, H., & Smagghe, G. (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of Insect Physiology*, 56, 227-235.
- Jeang, K. T. (2012). RNAi in the regulation of mammalian viral infections. *BMC Biology*, 10, 1-6.
- Jing, Y. A. N. G., & Han, Z. J. (2014). Efficiency of different methods for dsRNA delivery in cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Journal of Integrative Agriculture*, 13, 115-123.
- Joga, M. R., Zotti, M. J., Smagghe, G., & Christiaens, O. (2016). RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. *Frontiers in Physiology*, 7, 553.
- Kaur, R., Choudhury, A., Chauhan, S., Ghosh, A., Tiwari, R., & Rajam, M. V. (2021). RNA interference and crop protection against biotic stresses. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27, 2357-2377.
- Khajuria, C., Buschman, L. L., Chen, M. S., Muthukrishnan, S., & Zhu, K. Y. (2010). A gut-specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 621-629.
- Kim, D. H., & Rossi, J. J. (2008). RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques*, 44, 613-616.
- Kolliopoulou, A., & Swevers, L. (2013). Functional analysis of the RNAi response in ovary-derived silkworm Bm5 cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43, 654-663.
- Kolliopoulou, A., & Swevers, L. (2014). Recent progress in RNAi research in Lepidoptera: Intracellular machinery, antiviral immune response and prospects for insect pest control. *Current Opinion in Insect Science*, 6, 28-34.
- Kumar, M., Gupta, G. P., & Rajam, M. V. (2009). Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. *Journal of Insect Physiology*, 55, 273-278.
- Kunte, N., McGraw, E., Bell, S., Held, D., & Avila, L. A. (2020). Prospects, challenges and current status of RNAi through insect feeding. *Pest Management Science*, 76, 26-41.
- Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 862-864.
- Lee, Y., Hur, I., Park, S. Y., Kim, Y. K., Suh, M. R., & Kim, V. N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *The EMBO Journal*, 25, 522-532.
- Li, J., Wang, X. P., Wang, M. Q., Ma, W. H., & Hua, H. X. (2013). Advances in the use of the RNA interference technique in Hemiptera. *Insect Science*, 20, 31-39.
- Li, X., Liu, X., Lu, W., Yin, X., & An, S. (2022). Application progress of plant-mediated RNAi in pest control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 1364.
- Li, Z., Zeng, B., Ling, L., Xu, J., You, L., Aslam, A. F., ... & Huang, Y. (2015). Enhancement of larval RNAi efficiency by over-expressing Argonaute2 in *Bombyx mori*. *International Journal of Biological Sciences*, 11, 176.

- Lima Filho, M., & LIMA, J. O. G. (2001). Massas 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 naturais. *Neotropical Entomology*, 30, 483-488.
- Liu, S., Jaouannet, M., Dempsey, D. M. A., Imani, J., Coustau, C., & Kogel, K. H. (2020). RNA-based technologies for insect control in plant production. *Biotechnology Advances*, 39, 107463.
- Long, W. H., & Hensley, S. D. (1972). Insect pests of sugar cane. *Annual Review of Entomology*, 17, 149-176.
- Luo, Y., Wang, X., Yu, D., & Kang, L. (2012). The SID-1 double-stranded RNA transporter is not required for systemic RNAi in the migratory locust. *RNA biology*, 9, 663-671.
- Maktura, G. C., J. Paranhos, B., & Marques-Souza, H. (2021). RNAi in fruit flies (Diptera: Tephritidae): Successes and challenges. *Journal of Applied Entomology*, 145, 740-756.
- Mao, Y. B., Cai, W. J., Wang, J. W., Hong, G. J., Tao, X. Y., Wang, L. J., ... & Chen, X. Y. (2007). Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25, 1307-1313.
- Mao, Y. B., Tao, X. Y., Xue, X. Y., Wang, L. J., & Chen, X. Y. (2011). Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. *Transgenic Research*, 20, 665-673.
- Mao, Y. B., Xue, X. Y., Tao, X. Y., Yang, C. Q., Wang, L. J., & Chen, X. Y. (2013). Cysteine protease enhances plant-mediated bollworm RNA interference. *Plant Molecular Biology*, 83, 119-129.
- Marques, M. O., Mutton, M., Azania, A., Tasso Junior, L. C., Nogueira, G., & Vale, D. (2006). Tópicos em tecnologia sucroalcooleira. Jaboticabal: Multipress, 101-120.
- Marrone, P. G. (2014). The market and potential for biopesticides. In *Biopesticides: state of the art and future opportunities* (pp. 245-258). American Chemical Society.
- Marrone, P. G. (2019). Pesticidal natural products—status and future potential. *Pest Management Science*, 75, 2325-2340.
- Martin, S. E., & Caplen, N. J. (2007). Applications of RNA Interference in Mammalian Systems?. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 8, 81-108.
- Maxwell, B., Boyes, D., Tang, J., Rodrigues, T., Desai, S., Cunningham, D., ... & NC, R. (2019). Enabling the RNA revolution; Cell-free dsRNA production and control of Colorado potato beetle. Disponível em: <http://www.globalengage.co.uk/pgc/docs/PosterMaxwell.pdf>. Acesso em: 10 de setembro de 2022.
- McEwan, D. L., Weisman, A. S., & Hunter, C. P. (2012). Uptake of extracellular double-stranded RNA by SID-2. *Molecular Cell*, 47, 746-754.
- Mendiola, S. Y., Civitello, D. J., & Gerardo, N. M. (2020). An integrative approach to symbiont-mediated vector control for agricultural pathogens. *Current Opinion in Insect Science*, 39, 57-62.
- Mitter, N., Worrall, E. A., Robinson, K. E., Li, P., Jain, R. G., Taochy, C., ... & Xu, Z. P. (2017). Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature Plants*, 3, 1-10.
- Montgomery, M. K. (2004). RNA interference. *RNA Interference, Editing, and Modification*, 3-21.
- Mu, X., Greenwald, E., Ahmad, S., & Hur, S. (2018). An origin of the immunogenicity of in vitro transcribed RNA. *Nucleic Acids Research*, 46, 5239-5249.
- Nie, Z., Zhou, F., Li, D., Lv, Z., Chen, J., Liu, Y., ... & Zhang, Y. (2013). RIP-seq of BmAgo2-associated small RNAs reveal various types of small non-coding RNAs in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC genomics*, 14, 1-15.

- Nishida, K. M., Saito, K., Mori, T., Kawamura, Y., Nagami-Okada, T., Inagaki, S., ... & Siomi, M. C. (2007). Gene silencing mechanisms mediated by Aubergine–piRNA complexes in *Drosophila* male gonad. *RNA*, 13, 1911-1922.
- Nitnavare, R. B., Bhattacharya, J., Singh, S., Kour, A., Hawkesford, M. J., & Arora, N. (2021). Next Generation dsRNA-Based Insect Control: Success So Far and Challenges. *Frontiers in Plant Science*, 2310.
- Nwokeoji, A. O., Nwokeoji, E. A., Chou, T., & Abou, T. (2022). A novel sustainable platform for scaled manufacturing of double-stranded RNA biopesticides. *Research Square*.
- Palli, S. R. (2014). RNA interference in Colorado potato beetle: steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. *Current Opinion in Insect Science*, 6, 1-8.
- Parra, J. R., & Zucchi, R. A. (2004). Trichogramma in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. *Neotropical Entomology*, 33, 271-281.
- Parrish, S., & Fire, A. (2001). Distinct roles for RDE-1 and RDE-4 during RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *RNA*, 7, 1397-1402.
- Parsons, K. H., Mondal, M. H., McCormick, C. L., & Flynt, A. S. (2018). Guanidinium-functionalized interpolyelectrolyte complexes enabling RNAi in resistant insect pests. *Biomacromolecules*, 19, 1111-1117.
- Peng, Y., Wang, K., Zhu, G., Han, Q., Chen, J., Elzaki, M. E. A., ... & Han, Z. (2020). Identification and characterization of multiple dsRNases from a lepidopteran insect, the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 162, 86-95.
- Pereira, B. T. Sequenciamento do baculovírus que infecta a broca-da-cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Polanczyk, R. A., Almeida, L. D., Padulla, L. F. L., & Alves, S. B. (2004). Pragas de cana-de-açúcar x métodos alternativos de controle. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 33, 14-17.
- Pong, S. K., & Gullerova, M. (2018). Noncanonical functions of micro RNA pathway enzymes—Drosha, DGCR 8, Dicer and Ago proteins. *FEBS letters*, 592(17), 2973-2986.
- Prentice, K., Smagghe, G., Gheysen, G., & Christiaens, O. (2019). Nuclease activity decreases the RNAi response in the sweetpotato weevil *Cylas puncticollis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 110, 80-89.
- PROMIP. A broca *Diatraea saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar e em outras culturas agrícolas no Brasil. Disponível em: <https://promip.agr.br/broca-diatraea-saccharalis-cultura-cana-acucar-outras-culturas-agricolas-brasil/>. Acesso em: 04 de setembro de 2022.
- Pugsley, C. E., Isaac, R. E., Warren, N. J., & Cayre, O. J. (2021). Recent advances in engineered nanoparticles for RNAi-mediated crop protection against insect pests. *Frontiers in Agronomy*, 3, 652981.
- Qi, X. L., Su, X. F., Lu, G. Q., Liu, C. X., Liang, G. M., & Cheng, H. M. (2015). The effect of silencing arginine kinase by RNAi on the larval development of *Helicoverpa armigera*. *Bulletin of Entomological Research*, 105, 555-565.
- Quan, G. X., Kanda, T., & Tamura, T. (2002). Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm white gene. *Insect Molecular Biology*, 11, 217-222.
- Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P., & Bhatnagar, R. K. (2002). Silencing of Midgut Aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by Double-stranded RNA Establishes Its Role as *Bacillus thuringiensis* Toxin Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 46849-46851.

- Reddy, K. R. K., & Rajam, M. V. (2016). Targeting chitinase gene of *Helicoverpa armigera* by host-induced RNA interference confers insect resistance in tobacco and tomato. *Plant Molecular Biology*, 90, 281-292.
- Rodrigues, T. B., Mishra, S. K., Sridharan, K., Barnes, E. R., Alyokhin, A., Tuttle, R., ... & Narva, K. E. (2021). First Sprayable double-stranded rRNA-based biopesticide product targets proteasome subunit beta type-5 in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Frontiers in Plant Science*, 12:728652.
- Rodríguez-Cabrera, L., Trujillo-Bacallao, D., Borrás-Hidalgo, O., Wright, D. J., & Ayrá-Pardo, C. (2010). RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. *Environmental Microbiology*, 12, 2894-2903.
- Roignant, J. Y., Carré, C., Mugat, B., Szymczak, D., Lepesant, J. A., & Antoniewski, C. (2003). Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *RNA*, 9, 299-308.
- Saleh, M. C., Tassetto, M., Van Rij, R. P., Goic, B., Gausson, V., Berry, B., ... & Andino, R. (2009). Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature*, 458, 346-350.
- Saleh, M. C., van Rij, R. P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P. H., & Andino, R. (2006). The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature Cell Biology*, 8, 793-802.
- Schott, D. H., Cureton, D. K., Whelan, S. P., & Hunter, C. P. (2005). An antiviral role for the RNA interference machinery in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 18420-18424.
- Sharath Chandra, G., Asokan, R., Manamohan, M., & Krishna Kumar, N. (2019). Enhancing RNAi by using concatemered double-stranded RNA. *Pest Management Science*, 75, 506-514.
- Shih, J. D., Fitzgerald, M. C., Sutherland, M., & Hunter, C. P. (2009). The SID-1 double-stranded RNA transporter is not selective for dsRNA length. *RNA*, 15, 384-390.
- Shukla, J. N., Kalsi, M., Sethi, A., Narva, K. E., Fishilevich, E., Singh, S., ... & Palli, S. R. (2016). Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. *RNA biology*, 13, 656-669.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., ... & Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, 107, 465-476.
- Silver, K., Cooper, A. M., & Zhu, K. Y. (2021). Strategies for enhancing the efficiency of RNA interference in insects. *Pest Management Science*, 77, 2645-2658.
- Singh, I. K., Singh, S., Mogilicherla, K., Shukla, J. N., & Palli, S. R. (2017). Comparative analysis of double-stranded RNA degradation and processing in insects. *Scientific Reports*, 7, 1-12.
- Singh, S., Gupta, M., Pandher, S., Kaur, G., Goel, N., & Rathore, P. (2019a). Using de novo transcriptome assembly and analysis to study RNAi in *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Scientific Reports*, 9, 1-16.
- Singh, S., Gupta, M., Pandher, S., Kaur, G., Goel, N., Rathore, P., & Palli, S. R. (2019b). RNA sequencing, selection of reference genes and demonstration of feeding RNAi in *Thrips tabaci* (Lind.) (Thysanoptera: Thripidae). *BMC Molecular Biology*, 20, 1-21.
- Spit, J., Philips, A., Wynant, N., Santos, D., Plaetinck, G., & Broeck, J. V. (2017). Knockdown of nuclease activity in the gut enhances RNAi efficiency in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, but not in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 81, 103-116.

- Surakasi, V. P., Mohamed, A. A., & Kim, Y. (2011). RNA interference of $\beta 1$ integrin subunit impairs development and immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, 57, 1537-1544.
- Swevers, L., Ioannidis, K., Kolovou, M., Zografidis, A., Labropoulou, V., Santos, D., ... & Smagghe, G. (2016). Persistent RNA virus infection of lepidopteran cell lines: interactions with the RNAi machinery. *Journal of Insect Physiology*, 93, 81-93.
- Swevers, L., Vanden Broeck, J., & Smagghe, G. (2013). The possible impact of persistent virus infection on the function of the RNAi machinery in insects: a hypothesis. *Frontiers in Physiology*, 4, 319.
- Syngenta. The future of biocontrols for agriculture at Syngenta's Ghent innovation center. Disponível em: <https://www.syngenta.be/nieuws/algemeen/future-biocontrols-agriculture-syngentas-ghent-innovation-center>. Acesso em 10 de setembro de 2022.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., ... & Mello, C. C. (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, 99, 123-132.
- Takiff, H. E., Chen, S. M., & Court, D. L. (1989). Genetic analysis of the rnc operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 171, 2581-2590.
- Tassetto, M., Kunitomi, M., & Andino, R. (2017). Circulating immune cells mediate a systemic RNAi-based adaptive antiviral response in *Drosophila*. *Cell*, 169, 314-325.
- Tenllado, F., Martínez-García, B., Vargas, M., & Díaz-Ruiz, J. R. (2003). Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnology*, 3, 1-11.
- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J. S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., ... & Smagghe, G. (2011). RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 57, 231-245.
- Tian, H., Peng, H., Yao, Q., Chen, H., Xie, Q., Tang, B., & Zhang, W. (2009). Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS One*, 4, e6225.
- Timmons, L., Court, D. L., & Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263, 103-112.
- Tomoyasu, Y., Miller, S. C., Tomita, S., Schoppmeier, M., Grossmann, D., & Bucher, G. (2008). Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology*, 9, 1-22.
- Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., ... & Phung, D. T. (2021). Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 1112.
- Turner, C. T., Davy, M. W., MacDiarmid, R. M., Plummer, K. M., Birch, N. P., & Newcomb, R. D. (2006). RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology*, 15, 383-391.
- Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., & Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & development*, 13, 3191-3197.
- Vatanparast, M., Kazzazi, M., Sajjadian, S. M., & Park, Y. (2021). Knockdown of *Helicoverpa armigera* protease genes affects its growth and mortality via RNA interference. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 108, e21840.

- Waltz, E. (2015). USDA approves next-generation GM potato. *Nature Biotechnology*, 33, 12-14.
- Wan, X. S., Shi, M. R., Xu, J., Liu, J. H., & Ye, H. (2021). Interference Efficiency and Effects of Bacterium-mediated RNAi in the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Science*, 21, 8.
- Wan, X. S., Shi, M. R., Xu, J., Liu, J. H., & Ye, H. (2021). Interference Efficiency and Effects of Bacterium-mediated RNAi in the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Science*, 21, 8.
- Wang, H., Gong, L., Qi, J., Hu, M., Zhong, G., & Gong, L. (2014). Molecular cloning and characterization of a SID-1-like gene in *Plutella xylostella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 87, 164-176.
- Wang, X. F., Chen, Z., Wang, X. B., Xu, J., Chen, P., & Ye, H. (2021). Bacterial-mediated RNAi and functional analysis of Natalisin in a moth. *Scientific Reports*, 11, 1-12.
- Whangbo, J. S., & Hunter, C. P. (2008). Environmental RNA interference. *Trends in genetics*, 24, 297-305.
- Whyard, S., Singh, A. D., & Wong, S. (2009). Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 824-832.
- Willow, J., Taning, C. N. T., Cook, S. M., Sulg, S., Silva, A. I., Smagge, G., & Veromann, E. (2021). RNAi targets in agricultural pest insects: advancements, knowledge gaps, and IPM. *Frontiers in Agronomy*.
- Winston, W. M., Molodowitch, C., & Hunter, C. P. (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295, 2456-2459.
- Winston, W. M., Sutherlin, M., Wright, A. J., Feinberg, E. H., & Hunter, C. P. (2007). *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 10565-10570.
- Winston, W. M., Sutherlin, M., Wright, A. J., Feinberg, E. H., & Hunter, C. P. (2007). *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 10565-10570.
- Xiong, Y., Zeng, H., Zhang, Y., Xu, D., & Qiu, D. (2013). Silencing the HaHR3 gene by transgenic plant-mediated RNAi to disrupt *Helicoverpa armigera* development. *International journal of biological sciences*, 9, 370.
- Xu, J., Wang, X. F., Chen, P., Liu, F. T., Zheng, S. C., Ye, H., & Mo, M. H. (2016). RNA interference in moths: mechanisms, applications, and progress. *Genes*, 7, 88.
- Yang, L., Tian, Y., Peng, Y. Y., Niu, J., & Wang, J. J. (2020). Expression dynamics of core RNAi machinery genes in pea aphids upon exposure to artificially synthesized dsRNA and miRNAs. *Insects*, 11, 70.
- You, L., Zhang, F., Huang, S., Merchant, A., Zhou, X., & Li, Z. (2020). Over-expression of rna interference (rna) core machinery improves susceptibility to rna in silkworm larvae. *Insect Molecular Biology*, 29, 353-362.
- Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., & Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, 118, 57-68.
- Zhang, H., Li, H. C., & Miao, X. X. (2013). Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. *Insect Science*, 20, 15-30.
- Zhang, H., Li, H., Guan, R., & Miao, X. (2015). Lepidopteran insect species-specific, broad-spectrum, and systemic RNA interference by spraying ds RNA on larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 155, 218-228.
- Zhang, X., Liu, X., Ma, J., & Zhao, J. (2013). Silencing of cytochrome P450 CYP6B6 gene of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) by RNAi. *Bulletin of entomological research*, 103, 584-591.

- Zhang, X., Zhang, J., & Zhu, K. Y. (2010). Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology*, 19, 683-693.
- Zhang, Y. L., Zhang, S. Z., Kulye, M., Wu, S. R., Yu, N. T., Wang, J. H., ... & Liu, Z. X. (2012). Silencing of molt-regulating transcription factor gene, CiHR3, affects growth and development of sugarcane stem borer, *Chilo infuscatellus*. *Journal of Insect Science*, 12, 91.
- Zhu, J. Q., Liu, S., Ma, Y., Zhang, J. Q., Qi, H. S., Wei, Z. J., ... & Li, S. (2012). Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsRNA of an insect-associated gene EcR. *PloS One*, 7, e38572.
- Zhu, K. Y., & Palli, S. R. (2020). Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference. *Annual Review of Entomology*, 65(1).
- Zotti, M., Dos Santos, E. A., Cagliari, D., Christiaens, O., Taning, C. N. T., & Smagghe, G. (2018). RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Management Science*, 74, 1239-1250.

2. ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE *Diatraea saccharalis*: PADRÃO DE EXPRESSÃO DO MRNA EM *D. saccharalis* DURANTE O DESENVOLVIMENTO E BUSCA POR POTENCIAIS GENES-ALVOS PARA RNAI

Resumo

A broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*, Fabricius, 1794) é uma praga devastadora que causa sérios prejuízos a cada ano aos produtores de cana-de-açúcar ao reduzir a produção de açúcar e etanol. O controle desta praga é difícil devido ao seu hábito de vida e rápido desenvolvimento. O manejo de pragas por meio de abordagens biotecnológicas, como o RNA de interferência (RNAi), surgiu como uma alternativa aos métodos convencionais aplicados. Para desenvolver uma abordagem de RNAi, a escolha dos genes alvo que podem desencadear uma resposta letal ou limitante no inseto-praga requer uma consideração cuidadosa. Para permitir a escolha de potenciais genes alvo, analisamos o transcriptoma de diversos estágios de desenvolvimento de *D. saccharalis*. O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina HiSeq 2000, e uma montagem *de novo* foi gerada. Um total de 155.951 *contigs* foram identificados, entre os quais 6.620 sequências foram diferencialmente expressas (DEGs) entre os estágios de desenvolvimento (ovo – 6º instar larval), que foram classificadas em oito *clusters* de acordo com o padrão de expressão gênica. Com relação à maquinaria principal de RNAi, identificamos homólogos para genes que atuam na absorção e transmissão celular de RNA dupla fita (dsRNA), processamento de dsRNA, atividade endonuclease, regulação, entre outros. A ocorrência de todos os componentes da rota de RNAi sugerem que a recalcitrância da espécie ao mecanismo não deriva da ausência de alguma função essencial, mas de outros fatores. Além disso, genes envolvidos em rotas de hormônios, resistência a inseticidas e ao trato digestório do inseto foram identificados como candidatos ao silenciamento gênico via RNAi. Assim, a análise do transcriptoma permitiu o desenvolvimento de um banco de dados de sequências que podem ser uma fonte de genes-alvo para o manejo de *D. saccharalis*.

Palavras-chave: Controle de pragas; Expressão gênica; Lepidoptera; RNA-seq.

Abstract

The sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*, Fabricius, 1794) is a devastating pest that causes severe damage yearly to sugarcane producers by reducing sugar and ethanol production. Controlling this pest is difficult due to its feeding behavior and rapid development. Pest management through biotechnological approaches such as RNA interference (RNAi) has emerged as an alternative to currently applied methods in recent years. To develop an RNAi approach, choosing target genes that can trigger a lethal or limiting response in the insect pest requires careful consideration. To allow choosing a potential target gene, we analyzed the transcriptome of different developmental stages of *D. saccharalis*. Sequencing was performed on the Illumina HiSeq 2000 platform, generating a *de novo* assembly. A total of 155,951 contigs were identified, among which 6,620 sequences were differentially expressed (DEGs) between developmental stages (egg – 6th larval instar), classified into eight clusters according to gene expression pattern. Regarding the RNAi core machinery, we identified homologs for genes that act in the cellular uptake and transmission of double-stranded RNA (dsRNA), dsRNA processing, endonuclease activity, and regulation, among others. The occurrence of all components of the RNAi pathway suggests that the

species' recalcitrance to the machine does not derive from the absence of some essential function but other factors. In addition, genes involved in hormone pathways, insecticide resistance, and insect digestive tract were identified as candidates for gene silencing via RNAi. Thus, the transcriptome analysis allowed the development of a database of sequences that could be a source of target genes for managing *D. saccharalis*.

Keywords: Gene expression; Lepidoptera; Pest control; RNA-seq.

2.1. Introdução

Diatraea saccharalis, comumente conhecida como a broca da cana-de-açúcar, é uma importante praga da família Crambidae (Lepidoptera; Crambidae), que se distribui pelas Américas, incluindo América do Sul, Caribe, América Central e sudeste dos Estados Unidos (Box, 1931; UK, 1989; Dyar & Heinrich, 1927). As plantas hospedeiras de *D. saccharalis* incluem culturas importantes, como cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), sorgo (*Sorghum bicolor*), trigo (*Triticum* spp.), milho (*Zea mays* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.) (Myers, 1932; Rodríguez-del-Bosque *et al.*, 1988).

No Brasil, *D. saccharalis* é uma das principais pragas da cana-de-açúcar, causando danos e perdas na produção de açúcar e etanol que podem chegar a 10%, resultando em perda econômica de quase US\$ 4,6 bilhões/ano (Oliveira *et al.*, 2014). Em plantas jovens, esta praga causa um dano característico: primeiramente, ocorre o aparecimento em série de furos nas folhas ainda enroladas, e em seguida, começam a se alimentar do meristema apical, que acaba se deteriorando e resultando na condição conhecida como “coração morto”. Já em plantas mais desenvolvidas, após a eclosão, as larvas passam a se alimentar das folhas e migram para a região da bainha. Nesse local, as larvas começam a raspar e perfurar o caule. À medida que a broca se desenvolve, ela vai raspando o interior do colmo e abrindo galerias (Flynn *et al.*, 1984). Como resultado, a resistência física do caule da planta madura é reduzida, a biomassa da planta e o teor de açúcar diminuem e aumenta a suscetibilidade a fitopatógenos devido às perfurações realizadas pelas larvas no tecido do colmo (Cruz, 2007; Wilson *et al.*, 2017; dos Santos *et al.*, 2020).

Este comportamento de perfuração e permanência no interior dos tecidos pela larva acaba limitando o uso de estratégias químicas para o seu controle (Botelho & Macedo, 2002). O controle biológico também pode ser realizado por meio da liberação de *Trichogramma galloi*, parasitoide de ovos, e *Cotesia flavipes* que parasita as lagartas. Todavia, essa alternativa pode não ser tão eficiente, particularmente quando a predação de ovos é baixa ou em locais onde o parasitoide não se adapta (Parra & Zucchi, 2004), havendo necessidade de se

combinarem outros métodos de controle. Ademais, apesar de já terem sido aprovadas quatro variedades de cana-de-açúcar geneticamente modificadas no Brasil (CTNBio, 2022), em se tratando de tecnologia Bt, sua longevidade pode ser ameaçada devido à pressão de seleção sobre os raros indivíduos naturalmente resistentes. Assim, há demanda por outros métodos de controle, e o RNAi apresenta potencial para o controle da broca da cana-de-açúcar, assim como demonstrado para diversas outras pragas agrícolas (Baum *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2007; Huvenne & Smagghe, 2010; Bellés, 2010; Hernández-Soto & Chacón-Cerdas, 2021; Willow *et al.*, 2021; Kaur *et al.*, 2021).

Embora o RNAi seja um mecanismo celular altamente conservado em eucariotos, e seu uso para o controle de insetos herbívoros pareça ser simples, a eficácia do RNAi permanece variável dependendo dos genes alvo, estágios de vida e organismos a serem controlados (Alamalakala *et al.*, 2018). Para o RNAi ser bem-sucedido, a escolha dos genes essenciais que podem desencadear uma resposta letal de RNAi no inseto-praga requer uma consideração cuidadosa. A seleção do gene alvo é crucial, mas desafiadora, especialmente para as espécies de pragas que geralmente são difíceis de criar em laboratório ou aquelas que não possuem as ferramentas genômicas e genéticas necessárias para um *high-throughput-screen*. Nesses casos, os dados de insetos modelos apropriados podem ser utilizados para a identificação do gene alvo (Ulrich *et al.*, 2015; Alamalakala *et al.*, 2018). A seleção do gene a ser silenciado pode afetar significativamente o resultado dos efeitos de RNAi nos insetos (Katoch *et al.*, 2013). Terenius *et al.* (2011) após a análise geral de resultados experimentais de RNAi de lepidópteros, observaram que dos 130 genes usados para a análise, apenas 38% foram silenciados em níveis elevados, enquanto 48% e 14% dos genes não foram silenciados ou foram silenciados em níveis baixos, respectivamente.

A identificação de alvos essenciais é possível por meio de análise da literatura, de bancos de dados de sequências de DNA/RNA disponíveis e triagem de genes mediada por sequenciamento (Andrade & Hunter, 2016; Wang *et al.*, 2011). O sequenciamento de insetos não modelos aumentaram recentemente devido à disponibilidade de plataformas de sequenciamento de DNA de alto rendimento com custos decrescentes. Esses esforços têm amplas implicações em estudos de genômica funcional de insetos, aumentando o rendimento da identificação de alvos de RNAi e desenvolvimento de tecnologias de manejo de insetos (Alamalakala *et al.*, 2018).

Desse modo, buscamos analisar o transcriptoma de *Diatraea saccharalis* para identificar potenciais genes-alvos para silenciamento via RNAi, bem como genes relacionados à maquinaria RNAi na espécie, a fim de investigar se os componentes de RNAi estariam

presentes na espécie, possibilitando, portanto, o uso de RNAi para silenciamento gênico e controle do inseto.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1 Criação de insetos

As lagartas de *D. saccharalis* foram fornecidas pelo Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP (Piracicaba, SP, Brasil). Os insetos foram criados em tubos de vidro de fundo plano (2,5 cm) contendo dieta artificial sob condições de laboratório controladas (temperatura 26 ± 2 °C; 60 ± 10 % de umidade relativa; fotoperíodo de 14 h).

2.2.2 Extração de RNA de *D. saccharalis* e sequenciamento de Illumina

A construção das bibliotecas para sequenciamento dos transcritos de *D. saccharalis* foi realizada previamente pelo Dr. Roberto Camargo, ex-integrantes do grupo do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA-USP). O RNA total foi extraído separadamente de cada pool de indivíduos, compreendo os estágios de desenvolvimento de ovo e primeiro ao sexto instar larval de *D. saccharalis* e as amostras foram armazenadas a -80 °C até o uso. Para isto, foi utilizado o reagente TRIzol (Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de 1% agarose. A concentração de RNA foi estimada usando NanoDrop 1000 (Thermo-Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). Uma média de 10 µg de RNA total de cada estágio de desenvolvimento (ovo, 1°, 2°, 3°, 4°, 5° e 6° instar larval) foi enviado, em gelo seco, para Macrogen (Seul, Coréia do Sul) para construção e sequenciamento das bibliotecas de cDNA usando um HiSeq 2000 (Illumina). Primeiramente, as amostras de RNA total foram avaliadas para qualidade e integridade empregando Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Após a aprovação nesses testes, quatro bibliotecas foram construídas, uma com amostras de ovos e as outras unificando 2 instares cada (primeiro e segundo instares; terceiro e quarto instares; e quinto e sexto instares) usando o kit *TruSeq RNASample Prep* (Illumina, San Diego, CA, EUA), e estas foram sequenciados de cada extremidade (*paired-end read*).

2.2.3 Processamento de dados, montagem do transcriptoma *de Novo* e anotação funcional dos transcritos

Em parceria com o Dr. Bruno Evaristo de Almeida Fantinatti, do Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP)

e o Dr. Geysson Javier Fernandez Garcia, também do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, as leituras *paired-end* finais geradas foram processadas e aquelas de baixa qualidade foram removidas. Do total de leituras *paired-end* geradas, 86% foram utilizadas para a montagem *de novo* do transcriptoma (*de novo assembly*) usando Trinity (Haas *et al.*, 2013). A ausência de um genoma de referência para *D. saccharalis* levou ao uso de um *pipeline* de montagem de transcriptoma *de novo*. RSEM (*RNA-Seq by Expectation Maximization*) foi usado para identificar a abundância de transcritos, estimando o número de leituras mapeadas por *contig*, e DEseq do pacote *Bioconductor* / R foi usado para identificar os transcritos diferencialmente expressos entre bibliotecas de estágios de desenvolvimento (Gentleman *et al.*, 2004).

Após a montagem do transcriptoma e obtenção da lista de *contigs*, foi conduzida a anotação funcional por análise de ontologia gênica (GO) empregando Blast2Go. As sequências foram lançadas contra o banco de dados não redundante (nr) do NCBI usando BLASTx com um valor de *cut-off* de 10^{-3} seguido de anotação funcional usando parâmetros padrão do software (Götz *et al.*, 2008). Os *contigs* foram mapeados contra as vias metabólicas e moleculares de invertebrados conhecidos usando o *KEGG Automatic Annotation Server* (KAAS) online (Moriya *et al.*, 2007).

2.2.4 Validação de diferenças na expressão gênica entre estágios de desenvolvimento por análise quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

Para validar os dados obtidos do RNA-seq, foi conduzida a análise de expressão por RT-qPCR de 16 genes representando os oito *clusters* (dois genes por *cluster*) gerados a partir dos resultados de expressão diferencial, sendo que cada um dos *clusters* apresentam um determinado padrão de expressão ao longo dos estágios de desenvolvimento do inseto. Foram escolhidos os genes *arginine kinase*, *tubulin alpha chain*, *juvenile hormone esterase*, *tubulin beta chain*, *acetyl-CoA carboxylase*, *larval cuticle protein LCP-22*, *arylphorin subunit alpha*, *arylphorin subunit beta*, *carboxypeptidase D*, *cytochrome b5*, *chitinase A*, *lachesin*, *fatty acid synthase*, *circadian clock-controlled protein*, *endochitinase* e *apolipophorin*. A abordagem de validação por RT-qPCR foi usada para confirmar os padrões de expressão considerando a variação técnica e biológica devido à ausência de replicatas biológicas das bibliotecas de RNA-seq. Como o objetivo do trabalho original era obter sequências de potenciais genes alvo, optou-se na ocasião não utilizar replicatas biológicas de forma a reduzir custos.

O cDNA de *D. saccharalis* foi sintetizado a partir de 1000 ng de RNA de quatro réplicas biológicas para cada estágio de desenvolvimento (ovos, 1º, 2º, 3º, 4º, 5º e 6º estágios

larvais). Primeiramente, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I e 20 U Ribolock (Fermentas, Burlington, Canadá) a 37°C por 30 min, e a reação foi interrompida pela adição de EDTA (50 mM) e aquecimento a 65°C por 10 min. Amostras de RNA tratadas com DNase foram transcritas em reações de 20 µL, contendo um micrograma de RNA, 5 mM DTT, 500 µM de cada dNTP, 2,5 µM oligo dT e 200 U Revertaid (Fermentas) em tampão apropriado a 50 °C por 30 min, seguido por inativação da enzima a 85 °C por 5 min.

Os *primers* foram desenhados utilizando o *software Primer3Plus* (v.2.4.0) (Untergasser *et al.*, 2007) e, em seguida, foram avaliados, quanto à sua qualidade (formação de dímeros e *hairpin*) na ferramenta online *Beacon Design* (Primer Biosoft). (ANEXO – Tabela 1). Além disso, cada uma dos pares de *primers* foram submetidos à uma análise de eficiência de amplificação por PCR usando o *software Miner* (Zhao & Fernald, 2005) (ANEXO – Tabela 2). As reações de RT-qPCR continham 1 µL de cDNA diluído (1:10), 5 µL de Fast SYBR Green Master Mix (Invitrogen), 0,2 µM de cada *primer* específico do gene e água livre de nuclease para completar um volume total de 10 µl. Ambos os testes de eficiência de *primer* e RT-qPCR foram realizados em um equipamento RotorGene-6000 (Qiagen). As amplificações foram conduzidas sob a ciclagem térmica de 50 °C por 10 min e 95 °C por 2 min, seguidos por 40 ciclos de três etapas de 95 °C por 15 s, 60-61 °C por 25 s e 72 °C por 30 s. Para cada reação, a curva de *melting* foi gerada para confirmar a produção de um único pico e descartar a possibilidade de dímeros de *primer* e formação de produto não específico. As reações foram conduzidas com duplicatas técnicas e quadruplicatas biológicas e controle negativo com ausência de *template* (cDNA). Os valores de C_Q foram utilizados para determinar a diferença de expressão gênica de acordo com o método “Delta Delta” (Schmittgen & Livak, 2001). O gene de referência utilizado foi o gene *RpS19* (proteína ribossomal S19) de *D. saccharalis*.

2.2.5 Busca de genes envolvidos com o mecanismo de RNA de interferência em *D. saccharalis* e potenciais alvos RNAi na espécie

Os dados do transcriptoma *D. saccharalis* foram consultados com a finalidade de encontrar o conjunto básico de genes da maquinaria de RNAi. Para isto, uma lista de genes que codificam proteínas associadas a rota de RNAi foi construída com base na literatura, e empregando BLASTx contra o banco de transcritos de *D. saccharalis* considerando *E-value* < e⁻³⁰, com proteínas correspondentes em outras espécies de Lepidópteros.

Os principais passos funcionais da via de RNAi investigados incluíram a absorção de dsRNA por enzimas *Sid-like* (Genbank id#: XP_030028938.1 e XP_004930735.1); clivagem

de dsRNA em siRNA / miRNA por Dicer (AVK59441.1 e XP_028170236.1) e Drosha (XP_022826597.1 e XP_030022362.1); membros presumíveis do *RNA-induced silencing complex* (complexo RISC), incluindo helicases presumíveis como *Armitage* (XP_028158761.1 e XP_026759313.1) e *SpindleE* (XP_013183580.1 e XP_028166135.1); ligação ao dsRNA como *R2D2* (NP_001182007.1 e OWR45521.1) e *Loquacious* (AVK59445.1); degradação do dsRNA por endonucleases da família Argonauta (NP_001095931.1 e OWR47741.1) e *Aubergine* (OWR52118.1 e XP_014363696.1); transmissão do dsRNA para células vizinhas através de enzimas como *Exportina* (XP_013181864.1 e XP_021187744.1) e Clatrina (*Chc - clathrin heavy chain*) (XP_028040056.1 e XP_022831631.1); regulação do mecanismo com dsRNases e exoribonucleases (AYE20402.1 e XP_028162339.1); e por fim, genes que codificam demais proteínas que possam de alguma maneira estar envolvidas no processo de RNAi no inseto, entre elas helicases (Spindle-E) (XP_013183580.1 e XP_028166135.1) e exonucleases (MUT-7) (XP_028162339.1).

Além de utilizar os dados do transcriptoma de *D. saccharalis* para identificar os genes envolvidos no mecanismo de RNAi, também foram buscados genes relacionados a vias metabólicas do inseto, incluindo síntese e metabolismo do hormônio juvenil e do hormônio ecdisônio, e genes envolvidos em rotas de resistência a inseticidas. Também foram buscados genes relacionados ao trato digestivo do inseto, já que um dos principais métodos de entrega de dsRNA consiste na alimentação / ingestão das moléculas de dsRNA pelo inseto alvo. Isto foi feito com o propósito de identificar possíveis potenciais genes-alvos RNAi, dada a importância que os genes envolvidos em tais rotas desempenham na sobrevivência do inseto. Como referência para a identificação de genes da síntese de hormônios utilizamos membros da via de síntese de *Bombyx mori* (KEGG Entry: bmor00981). Já a busca de genes comumente relacionados com a via de resistência a inseticidas foi baseada no conteúdo discutido por Palli (2020), incluindo então os genes *citocromo P450 monooxigenases*, *glutathione S-transferases*, *UDP-glucuronosiltransferase*, *carboxilesterases*, *transportadores de membrana ABC (ATP-binding cassette)* e *fatores de transcrição CNC-bZIP*. A partir das sequências dos transcritos, realizamos um BLASTx contra sequências correspondentes destas proteínas de *B. mori* e, aquelas que apresentaram $E\text{-value} < e^{-30}$, foram selecionadas. A mesma metodologia foi utilizada para os genes relacionados ao trato digestivo; isto é, a partir da sequência dos transcritos, realizou-se um BLASTx contra demais sequências homólogas de demais espécies de lepidópteros (GenBank: AWI47792.1, AAN63949.1, XP_030023351.1 e CAF25190.1), levando-se em conta os resultados que apresentaram $E\text{-value} < e^{-30}$.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1 Padrão de expressão do mRNA em *D. saccharalis* durante o desenvolvimento

Foi realizada uma montagem *de novo* do transcriptoma de *D. saccharalis* com o objetivo de identificar sequências gênicas relacionados a maquinaria central do mecanismo de RNAi e outras com potencial de serem empregadas como genes-alvo para silenciamento e controle do inseto-praga. No momento do início deste projeto, não havia dados disponíveis para basearmos a nossa busca, que foram publicados posteriormente com o primeiro *draft* do genoma de *D. saccharalis* obtido usando o sequenciamento de genoma completo Illumina HiSeq 2500 de um espécime masculino adulto (dos Santos *et al.*, 2020). Em seguida, foi publicado um transcriptoma montado *de novo* a fim de investigar a regulação da expressão gênica de *D. saccharalis* colonizado pelo endoparasitóide larval *Cotesia flavipes* (Merlin & Cônsoli, 2019) e um transcriptoma de intestino de larvas de *D. saccharalis* analisando a expressão diferencial destacando as características fisiológicas desta praga em resposta a duas dietas: cana-de-açúcar e dieta artificial (Noriega *et al.*, 2020).

Analisamos o transcriptoma do desenvolvimento de *D. saccharalis* dos estágios de ovo até o 6º instar larval agrupados por RNA-seq. De um total de 15.5951 *contigs* obtidos, foram encontrados 6.620 genes diferencialmente expressos (*differentially expressed genes* - DEG) ($p \leq 0,05$; $|fold\ change| \geq 2$), um número significativamente superior ao encontrado com a análise do transcriptoma de *Tuta absoluta*, por exemplo, no qual foram identificados 3.917 DEG (Camargo *et al.*, 2015).

A inspeção dos DEGs por meio da análise de componentes principais (PCA) mostrou que os dados de expressão gênica foram capazes de discriminar o estágio do ovo dos estágios das larvas (1º a 6º instar), assim como demonstrado por Camargo *et al.* (2015), que identificou para *T. absoluta*, um total de 1.577 genes expressos diferencialmente entre ovos e os estágios larvais, o que representa mais da metade dos DEGs encontrados. Além disso, entre os estágios das larvas, ficou claro que os ínstars 1 a 4 apresentam padrão de expressão mais intimamente relacionados em comparação com os ínstars 5 e 6 (Figura 1a).

A expressão gênica dinâmica foi avaliada por agrupamento *k-means* (*k-means clustering*) dos dados de expressão dos transcritos. Os genes diferencialmente expressos foram então agrupados em oito *clusters* (Figura 1b). Examinando os agrupamentos (*clusters*), é possível observar dois grupos de transcritos regulados: transcritos com regulação positiva, ou *upregulated* (*Clusters* 1 a 4), e transcritos com regulação negativa, *downregulated* (*Clusters* 5 a 6). Além disso, dinâmicas especiais, como expressão transitória de transcritos (*Clusters* 1, 2, 3 e 5) e dinâmica exponencial (*Cluster* 4, 6 e 7) puderam ser observadas.

Curiosamente, encontramos uma dinâmica específica no *cluster* 8 que se caracteriza pela oscilação na expressão dos transcritos (Figura 1c). Esta análise de *clusters* se justifica importante aliada na busca de genes alvo potenciais com padrão de expressão mais intensa nos primeiros instares, por exemplo, uma vez que o silenciamento desses alvos poderia resultar no melhor controle da infestação, minimizando a imposição de danos.

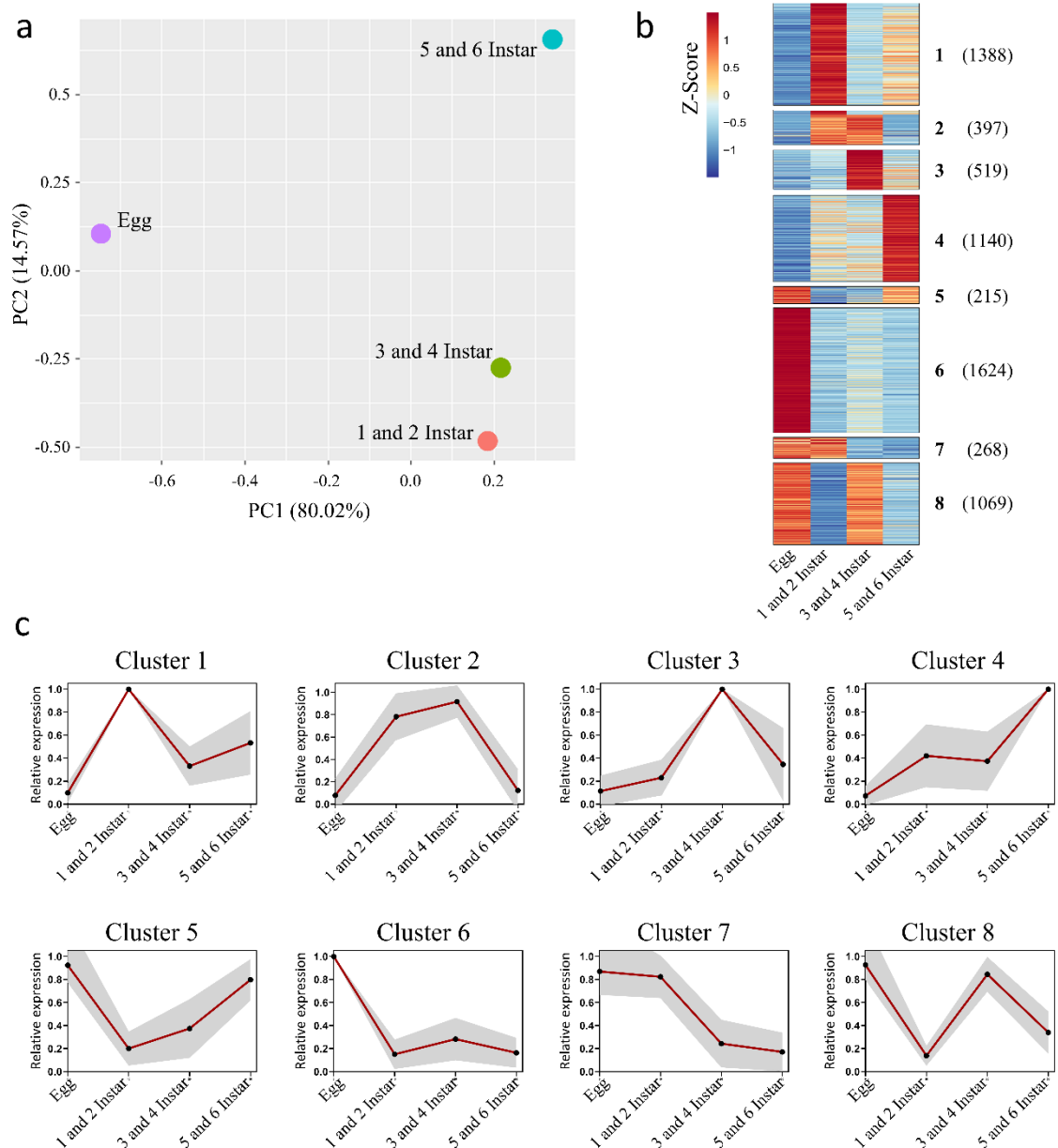


Figura 4. Perfil de expressão gênica durante o desenvolvimento de *Diatraea saccharalis*. (a) Análise de componentes principais da expressão gênica dos estágios de desenvolvimento do inseto. A porcentagem de variação explicada por cada componente principal é indicada. (b) *Heatmap* do curso temporal da expressão gênica derivada do RNA-seq revelando oito agrupamentos temporais ao longo dos estágios de desenvolvimento da espécie; o tamanho da expressão de cada agrupamento é indicado entre parênteses. (c) Perfis temporais calculados; sombras cinza indicam desvio padrão.

Foram realizadas análises de enriquecimento de termos dos conjuntos de genes para identificar as categorias de ontologia gênicas sobrerrepresentadas de transcritos expressos diferenciais durante o desenvolvimento de *D. saccharalis* (Figura 2). Esta análise revelou que os transcritos expressos regulados positivamente (*cluster* 1 a 4) estão relacionados ao metabolismo de gasto de energia, processo catabólico da proteína proteossômica, desenvolvimento muscular e resposta a espécies reativas de oxigênio, todos relacionados ao metabolismo ativo durante o desenvolvimento. Interessantemente, destacamos que todos esses processos biológicos apresentam uma ordem temporal, em que processos biológicos relacionados ao metabolismo de energia, ocorrem como eventos precoces durante a diferenciação (*cluster* 1 e 2) (Lawrence, 1975). Além disso, o processo biológico relacionado ao comprometimento do destino das células musculares e à resposta ao estresse oxidativo ocorrem como eventos um pouco mais tardios (*cluster* 3 e 4) (Kodrík *et al.*, 2015; Felton & Summers, 1995).

Por outro lado, genes regulados negativamente apresentam enriquecimento para vias de sinalização *Notch*, morte celular, adesão celular, macroautofagia e atividade da JUN quinase (JNK) (Figura 2). Em particular, processos biológicos como a sinalização *Notch* e morte celular programada apresentam uma regulação descendente transitória que se inicia elevada nos estágios iniciais de desenvolvimento, segue nos instares 3 e 4 e chega ao nível basal no final do 6º instar (*Cluster* 5) (Gridley, 1997; Wilson *et al.*, 2010; Fahrbach *et al.*, 2012). Também é relevante o fato de que os transcritos relacionados à atividade da JNK foram negativamente regulados no início do desenvolvimento (*Cluster* 6 e 7) e mantidos em decréscimo até o final do 6º instar, corroborando o fato de esta proteína da família MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*), além de ser induzida por estresse e citocinas inflamatórias, também participar do fechamento dorsal, um processo morfogênético durante a embriogênese média que envolve o movimento das células epiteliais (Sluss *et al.*, 1996).

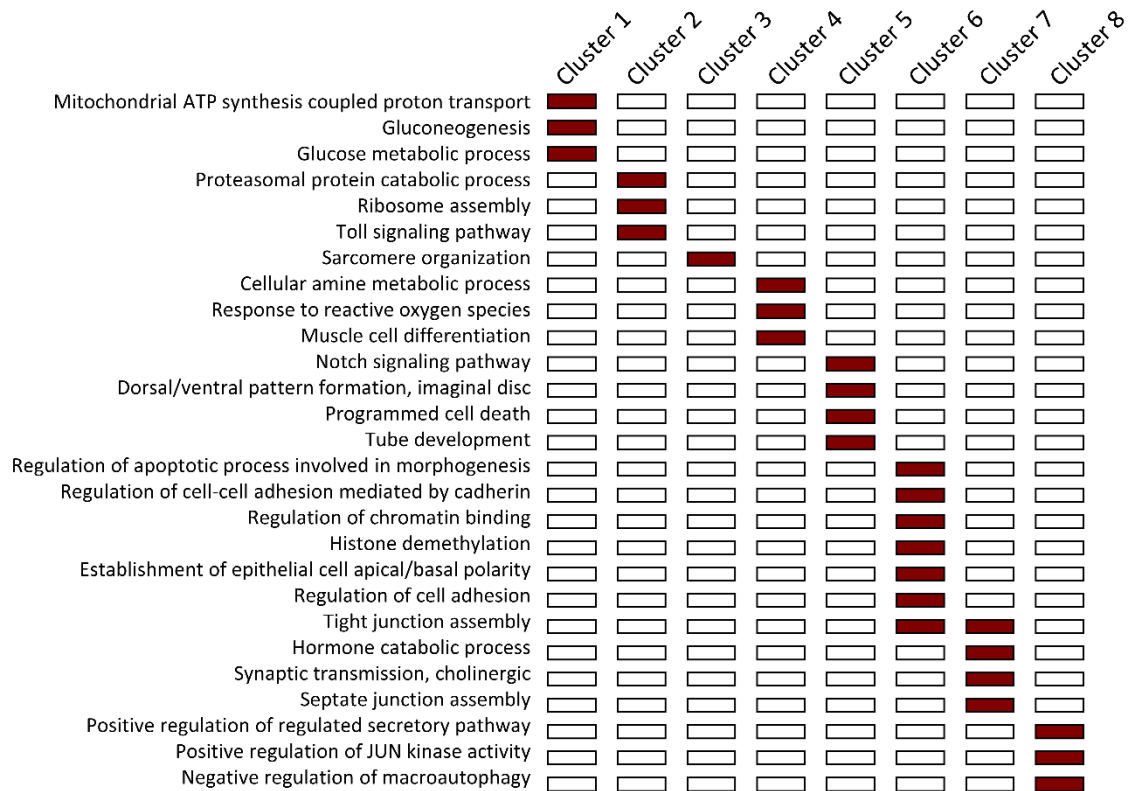


Figura 5. Análise de enriquecimento por conjunto de genes de *Diatraea saccharalis* diferencialmente expressos nos oito perfis temporais determinados via análise de RNAseq (Clusters 1 a 8). Quadrado vermelho significa enriquecimento para a via em questão.

2.3.2 Validação da expressão dos genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados a partir do transcriptoma de *D. saccharalis*, via RT-qPCR

Para validar os dados de RNA-seq de *D. saccharalis*, escolhemos dois genes diferencialmente expressos (DEGs) de cada um dos oito *clusters* de padrão de expressão identificados (*contigs* 48806, 47322, 43718, 40745, 45727, 52614, 47285, 49658, 44567, 52801, 47949, 52478, 43175, 50760, 50776 e 52920) que possuíam importância biológica potencial. Primeiramente, realizamos a análise de eficiência dos pares de *primers* para cada um dos 16 DEGs selecionados para validação. Essa análise foi realizada utilizando-se o algoritmo *PCR Miner* (Zhao & Fernald, 2005 acesso em: ewindup.info/miner/) e demonstrou que a eficiência de amplificação destes *primers* está acima de 80% (Zhao & Fernald, 2005) (ANEXO – Tabela Suplementar 2). A partir de então, as diferenças na expressão gênica entre os estágios de desenvolvimento do inseto foram estimadas por RT-qPCR usando *primers* específicos de genes (ANEXO: Tabela 1), com três réplicas biológicas, normalizadas para o gene de referência *Rps19*.

Entre os 16 transcritos analisados por RT-qPCR, todos eles (100%) apresentaram um padrão de acumulação de transcritos muito semelhante ao derivado dos dados de RNA-seq de acordo com o *cluster* que representam. Para os *contigs* 48806 e 47322, dos genes *tubulin alpha chain* e *arginine kinase* (Figura 3 A e B, respectivamente) representantes do *cluster* 1, foi possível observar um tipo de expressão transitória, ou seja, com um aumento no nível de expressão nos instares iniciais (1 e 2) em relação ao estágio de ovo, seguido de um decréscimo nos instares intermediários (3 e 4) e um novo aumento, porém mais sutil, nos últimos instares (5 e 6). Estes dois transcritos caracterizam-se por possuir uma regulação positiva, ou ainda, por serem *upregulated*. Já os *contigs* 43718 e 40745, dos genes *juvenile hormone esterase* e *CTP synthase*, membros do *cluster* 2, apresentaram uma regulação positiva e um aumento no nível de transcritos nos instares iniciais em relação ao ovo, que se mantém nos instares 3 e 4, e decrescem sua expressão nos instares finais (5 e 6) (Figura 4 A e B).

Para membros do *cluster* 3, os *contigs* 45727 (*larval cuticle protein LCP-22*) e 52614 (*acetyl-CoA carboxylase*), também com regulação positiva, se caracterizaram por apresentar um nível de expressão significativamente superior nos instares larvais 3 e 4 em relação aos demais. Os estágios larvais iniciais (instares 1 e 2) apresentam um leve aumento da expressão gênica em relação ao estágio de ovo; enquanto nos instares finais (5 e 6) houve uma redução em comparação com a expressão no nível anterior, porém, a expressão se manteve um pouco maior que a fase de ovo e instares iniciais (Figura 5 A e B). O *cluster* 4 é constituído por *contigs up regulated*, assim como os demais *clusters* anteriores, diferencia-se dos demais por apresentar um padrão de expressão exponencial, e não transitória. A expressão dos *contigs* 47285 (*arylphorin subunit alpha*) e 49658 (*arylphorin subunit beta*) mostraram isso, conforme pode ser observado na Figura 6 A e B. A expressão dos genes em questão aumentam conforme os estágios de desenvolvimento do inseto avançam.

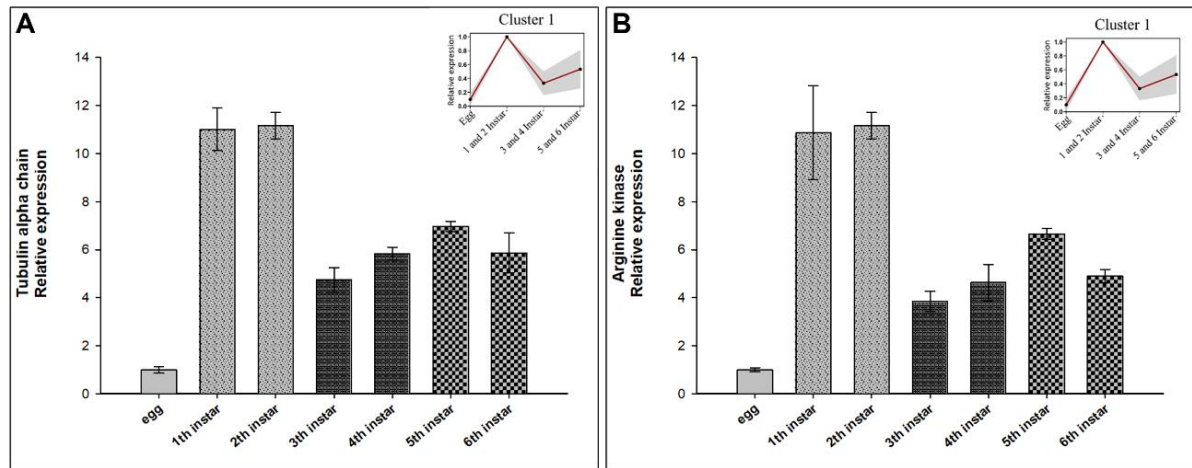


Figura 6. Expressão gênica relativa dos contigs 48806 (*tubulin alpha chain*) (A) e 47322 (*arginine kinase*) (B), representantes do *cluster 1* do transcriptoma de *Diatraea saccharalis* ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento do inseto (ovo e primeiro ao sexto instar larval) por RT-qPCR (n=4). O gene de referência utilizado foi o *ribosomal protein 19 (Rps19)* de *D. saccharalis*. A normalização das análises foi feita com base no estágio de desenvolvimento de ovo. O painel no canto superior direito indica o padrão de expressão do *cluster 1*, do qual este gene em análise faz parte, com a validação do padrão de expressão estimado por RNA-seq.

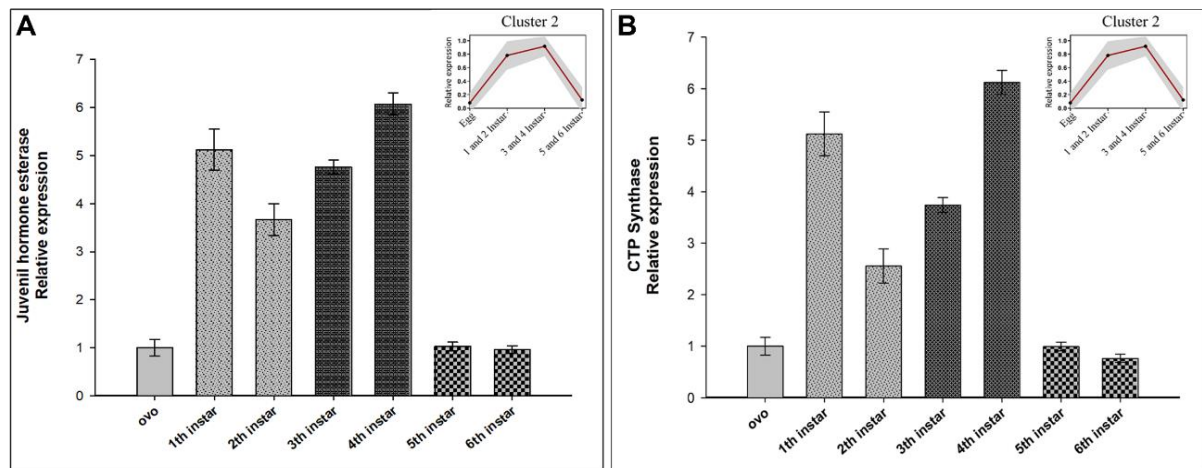


Figura 4. Expressão relativa dos contigs 43718 (*juvenil hormone esterase*) (A) e 40745 (*CTP synthase*) (B), representante do *cluster 2* do transcriptoma de *Diatraea saccharalis*, ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento do inseto (ovo e primeiro ao sexto instar larval) por RT-qPCR (n=4). O gene de referência utilizado foi o *ribosomal protein 19 (Rps19)* de *D. saccharalis*. A normalização das análises foi feita com base no estágio de desenvolvimento de ovo. O painel no canto superior direito indica o padrão de expressão do *cluster 2*, do qual este gene em análise faz parte, com a validação do padrão de expressão estimado por RNA-seq.

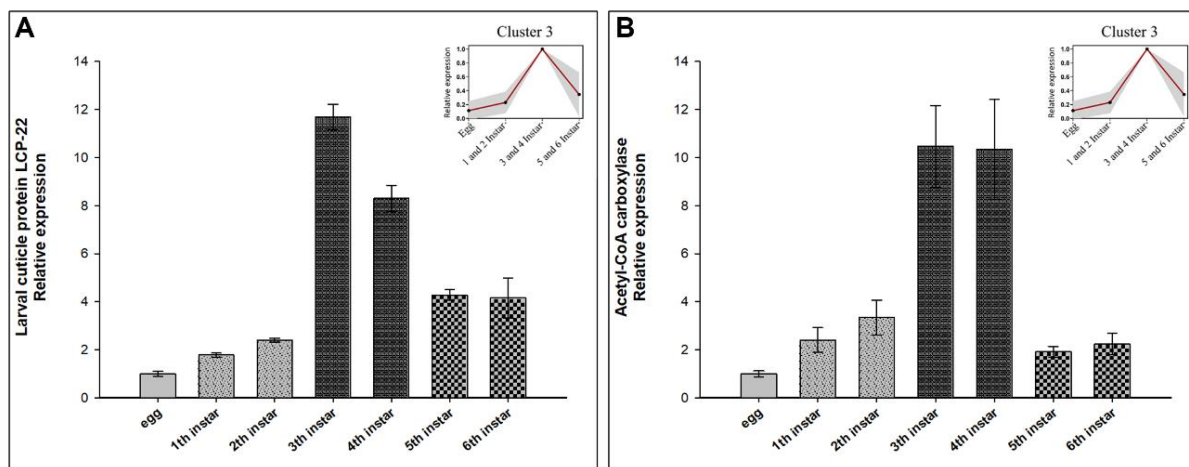


Figura 5. Expressão relativa dos contigs 45727 (*larval cuticle protein LCP-22*) (A) e 52614 (*acetyl-CoA carboxylase*) (B), representes do *cluster 3* do transcriptoma de *Diatraea saccharalis*, ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento do inseto (ovo e primeiro ao sexto instar larval) por RT-qPCR (n=4). O gene de referência utilizado foi o *ribosomal protein 19 (Rps19)* de *D. saccharalis*. A normalização das análises foi feita com base no estágio de desenvolvimento de ovo. O painel no canto superior direito indica o padrão de expressão do *cluster 3*, do qual este gene em análise faz parte, com a validação do padrão de expressão estimado por RNA-seq.

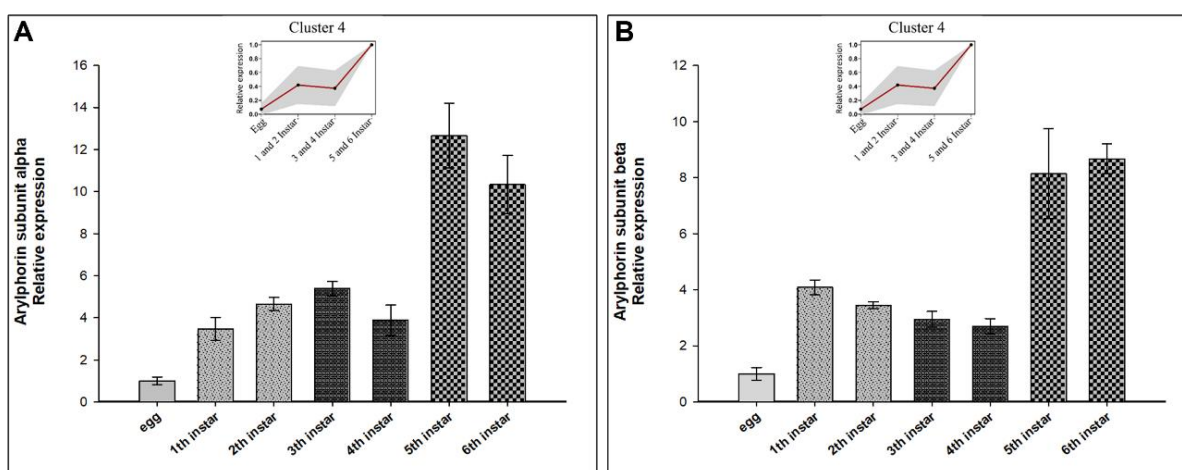


Figura 6. Expressão relativa dos contigs 47285 (*arylphorin subunit alpha*) (A) e 49658 (*arylphorin subunit beta*) (B), representantes do *cluster 4* do transcriptoma de *Diatraea saccharalis*, ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento do inseto (ovo e primeiro ao sexto instar larval) por RT-qPCR (n=4). O gene de referência utilizado foi o *ribosomal protein 19 (Rps19)* de *D. saccharalis*. A normalização das análises foi feita com base no estágio de desenvolvimento de ovo. O painel no canto superior direito indica o padrão de expressão do *cluster 4*, do qual este gene em análise faz parte, com a validação do padrão de expressão estimado por RNA-seq.

A segunda categoria de transcritos regulados negativa (*down regulated*), compreendia o conjunto de *clusters 5, 6, 7 e 8*. Os contigs 44567 (*Cytochrome b5*) e 52801 (*carboxypeptidase D*), selecionados para validação da expressão diferencial do *cluster 5*, demonstraram um nível mais elevado de expressão no estágio de ovo e nos últimos estágios de desenvolvimentos (instares 5 e 6) (Figura 7 A e B). Para os contigs 47949 (*chitinase A*) e 52478 (*lachesin*), membros do *cluster 6*, observou-se uma expressão muito mais elevada no

estágio de ovo, com relação à fase larval, sendo a dinâmica de decréscimo temporal da expressão gênica nesta classe, exponencial (Figura 8 A e B). No *cluster 7*, a dinâmica da expressão gênica também é exponencial, diminuindo a expressão com o passar dos estágios de desenvolvimento do inseto (Figura 9 A e B), que apresenta a expressão relativa dos *contigs* 43175 (*circadian clock-controlled protein*) e 50760 (*fatty acid synthase*). Por fim, na análise para os integrantes do *cluster 8*, *contigs* 50776 (*endochitinase*) e 52920 (*apolipoporphins*), foi encontrada uma dinâmica específica, que se caracteriza pela oscilação na expressão dos transcritos conforme ocorre a transição entre as diferentes fases de desenvolvimento do inseto (Figura 10 A e B).

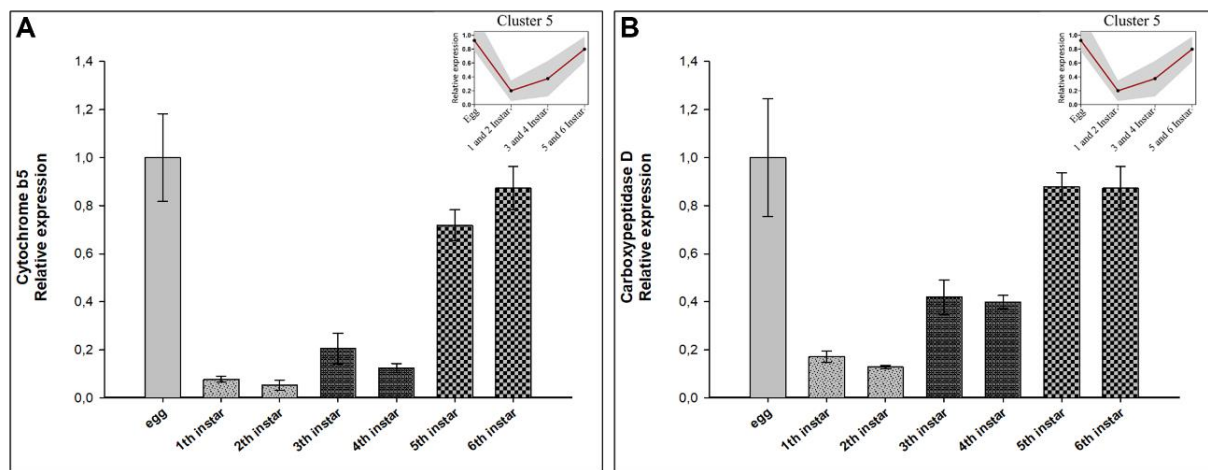


Figura 7. Expressão relativa dos *contigs* 44567 (*cytochrome b5*) (A) e 52801 (*carboxypeptidase D*) (B), representantes do *cluster 5* do transcriptoma de *Diatraea saccharalis*, ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento do inseto (ovo e primeiro ao sexto instar larval) por RT-qPCR (n=4). O gene de referência utilizado foi o *ribosomal protein 19 (Rps19)* de *D. saccharalis*. A normalização das análises foi feita com base no estágio de desenvolvimento de ovo. O painel no canto superior direito indica o padrão de expressão do *cluster 5*, do qual este gene em análise faz parte, com a validação do padrão de expressão estimado por RNA-seq.

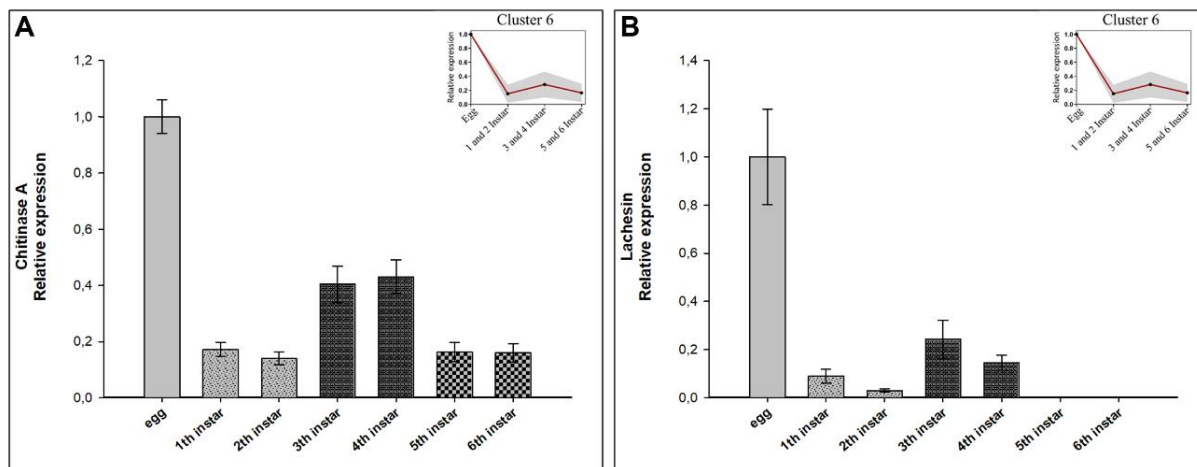


Figura 8. Expressão relativa dos *contigs* 47949 (*chitinase A*) (A) e 52478 (*lachesin*) (B), representantes do *cluster* 6 do transcriptoma de *Diatraea saccharalis*, ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento do inseto (ovo e primeiro ao sexto instar larval) por RT-qPCR (n=4). O gene de referência utilizado foi o *ribosomal protein 19 (Rps19)* de *D. saccharalis*. A normalização das análises foi feita com base no estágio de desenvolvimento de ovo. O painel no canto superior direito indica o padrão de expressão do *cluster* 6, do qual este gene em análise faz parte, com a validação do padrão de expressão estimado por RNA-seq.

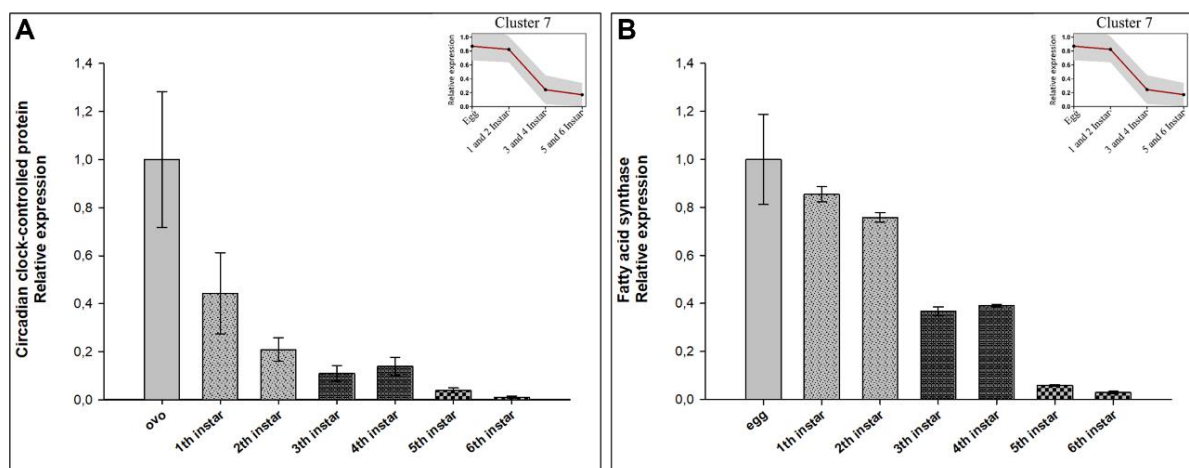


Figura 9. Expressão relativa dos *contigs* 43175 (*circadian clock-controlled protein*) (A) e 50760 (*fatty acid synthase*) (B), representantes do *cluster* 7 do transcriptoma de *Diatraea saccharalis*, o, ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento do inseto (ovo e primeiro ao sexto instar larval) por RT-qPCR (n=4). O gene de referência utilizado foi o *ribosomal protein 19 (Rps19)* de *D. saccharalis*. A normalização das análises foi feita com base no estágio de desenvolvimento de ovo. O painel no canto superior direito indica o padrão de expressão do *cluster* 7, do qual este gene em análise faz parte, com a validação do padrão de expressão estimado por RNA-seq.

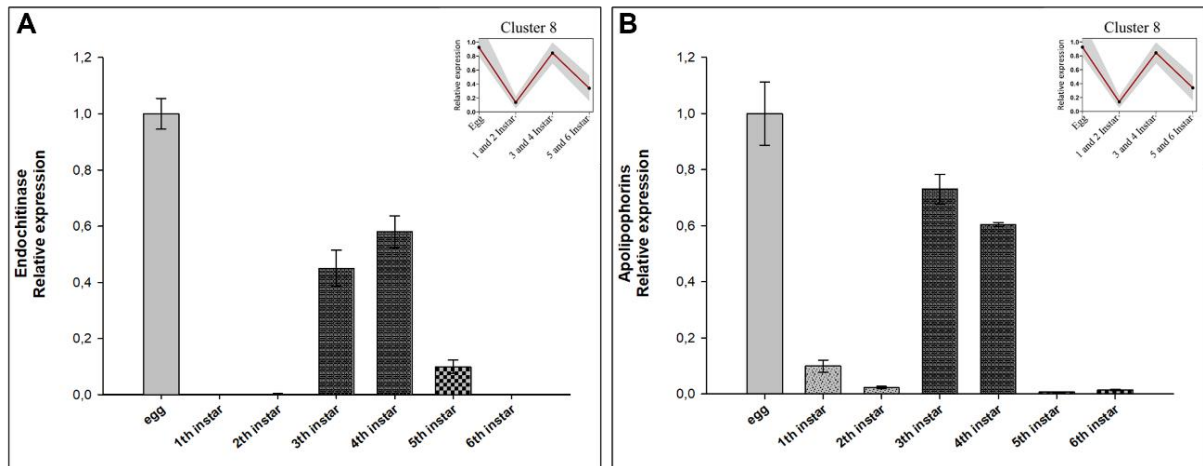


Figura 10. Expressão relativa dos contigs 50776 (*endochitinase*) e 52920 (*apolipophorins*), representantes do cluster 8 do transcriptoma de *Diatraea saccharalis*, ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento do inseto (ovo e primeiro ao sexto instar larval) por RT-qPCR (n=4). O gene de referência utilizado foi o *ribosomal protein 19 (Rps19)* de *D. saccharalis*. A normalização das análises foi feita com base no estágio de desenvolvimento de ovo. O painel no canto superior direito indica o padrão de expressão do cluster 8, do qual este gene em análise faz parte, com a validação do padrão de expressão estimado por RNA-seq.

2.3.3 Genes envolvidos no mecanismo de RNAi em *D. saccharalis*

Com relação à maquinaria principal do RNAi, identificamos homólogos para genes que atuam na absorção e transmissão celular de dsRNA, como *SID-1* (2 contigs), além de membros da família das proteínas exportinas, as quais servem como transportadores de troca de dsRNA entre o núcleo e o citoplasma como *exportin-1* (2 contigs), *exportin-5* (2 contigs) e *exportin-6* (1 contig), bem como homólogos para canais de clatrina (*clathrin heavy chain*) (3 contigs). Não encontramos, no entanto, sequências homólogas para *sid-2* (Tabela 1).

Adicionalmente, identificamos homólogos para *dicer-1* (1 contig), *dicer-2* (4 contigs) e *drosha* (2 contigs), consideradas proteínas *core* do sistema RNAi. Ainda no que diz respeito ao *core* da maquinaria RNAi, para as proteínas da família Argonauta, no transcriptoma de *D. saccharalis*, identificamos alguns homólogos para *Ago1* (5 contigs), *Ago2* (3 contigs) e *Ago3* (5 contigs). Ademais, também encontramos homólogos de genes de duas outras proteínas que também possuem atividade endonuclease, *Aubergine* (3 contigs) e *Armitage* (3 contigs) (Tabela 1).

Procurando por genes relacionados com vias de regulação de RNAi, identificamos homólogos para exonuclease *Eri-like* (1 contig) e para uma nuclease relacionada a eficiência RNAi em lepidópteros, a REase (Guan *et al.*, 2018) (1 contig) (Tabela 1). Finalmente, examinamos e identificamos alguns potenciais elementos envolvidos no processo de RNAi, como os fatores de ligação ao dsRNA *Loquacius* (2 contig), *R2D2* (2 contigs), *vasa intronic protein - Vig -* (1 contig), *ATP-dependent RNA helicase spindle-E - Spindle-E -* (4 contigs),

fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 - Fmr-1 - (1 contig), *exonuclease mut-7*- MUT-7 - (1 contig) e *vacuolar H⁺ ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit* - Vha16- (1 contig) (Tabela 1).

A Figura 11 resume e ilustra os *contigs* que foram identificados a partir do transcriptoma de *D. saccharalis* relacionados a genes envolvidos no processo de RNAi. Vale ressaltar que a proteína RNA polimerase dependente de RNA (RdRP), responsável por gerar siRNAs secundários a partir do siRNA primário e participar, assim, do sistema de amplificação do sinal de RNAi, (Sijen *et al.*, 2001) não é encontrada em insetos (Gordon & Waterhouse, 2007). Portanto, nenhum transcrito referente ao gene que codifica esta proteína foi encontrado no transcriptoma de *D. saccharalis*, assim como esperado.

Tabela 1. Genes putativamente associados ao mecanismo de RNAi em *Diatraea saccharalis* identificados

Nome	N° contigs	Contig ID	Proteínas correspondentes (Acesso ; Organismo)
Corte de dsRNA			
<i>Dicer-1</i>	1	comp74181_c0_seq1	<i>Dicer-1</i> (AVK59441.1 - <i>Spodoptera frugiperda</i> ; XP_028160127.1 - <i>Ostrinia furnacalis</i>)
<i>Dicer-2</i>	4	comp51983_c0_seq1; comp57654_c0_seq1; comp74928_c0_seq1; comp81036_c0_seq1	<i>Dicer-2 protein</i> (QAR48644.1 - <i>Chilo infuscatellus</i> ; XP_028170236.1 - <i>Ostrinia furnacalis</i> ; NP_001180543.1 - <i>Bombyx mori</i>)
<i>Drosha</i>	2	comp56476_c0_seq1; comp67245_c0_seq1	<i>ribonuclease 3</i> (XP_022826597.1 - <i>Spodoptera litura</i> ; XP_030022362.1 - <i>Manduca sexta</i>); <i>Drosha-PA</i> (AVK59440.1 - <i>Spodoptera frugiperda</i>)
Ligação ao dsRNA			
<i>Loquacious</i>	1	comp21971_c0_seq1	<i>Loquacious / RISC-loading complex subunit tarbp2-like</i> (AVK59445.1 - <i>Spodoptera frugiperda</i>)
<i>R2D2</i>	2	comp41859_c0_seq1; comp87330_c0_seq1	<i>R2D2 protein</i> (NP_001182007.1 - <i>Bombyx mori</i> ; OWR45521.1 - <i>Danus plexippus plexippus</i>)
Atividade endonuclease			
<i>Argonaute-1</i>	5	comp19030_c0_seq1; comp97162_c0_seq1; comp43388_c0_seq1; comp70727_c0_seq1; comp85704_c0_seq1	<i>argonaute 1</i> (NP_001095931.1 - <i>Bombyx mori</i> ; OWR47741.1 - <i>Danus plexippus plexippus</i>)
<i>Argonaute-2</i>	3	comp98218_c0_seq1; comp43999_c0_seq1	<i>argonaute-2-like</i> (XP_013174901.1 - <i>Papilio xuthus</i>); <i>argonaute-2</i> (XP_028167628.1 - <i>Ostrinia furnacalis</i>)
<i>Argonaute-3</i>	5	comp13364_c0_seq1; comp66347_c0_seq1; comp35289_c0_seq1; comp101943_c0_seq1; comp99146_c0_seq1	<i>argonaute 3</i> (BAF98575.1 - <i>Bombyx mori</i> ; AVP80830.1 - <i>Plutella xylostella</i>)
<i>Aubergine</i>	3	comp59546_c0_seq1; comp62575_c0_seq1; comp62575_c0_seq2	<i>aubergine protein</i> (OWR52118.1 - <i>Danus plexippus plexippus</i> ; XP_014363696.1 - <i>Papilio machaon</i>)
<i>Armitage</i>	3	comp21861_c0_seq1; comp43821_c0_seq1; comp73796_c0_seq1	<i>probable RNA helicase arni</i> (XP_028158761.1 - <i>Ostrinia furnacalis</i> ; XP_026759313.1 - <i>Galleria mellonella</i>)
Absorção e transmissão de dsRNA			
<i>Sid-1</i>	2	comp64849_c0_seq1; comp72918_c0_seq1	<i>SID1 transmembrane family member 1</i> (XP_030028938.1 - <i>Manduca sexta</i> ; XP_004930735.1 - <i>Bombyx mori</i>)
<i>Exportin-1</i>	2	comp107877_c0_seq1; comp116414_c0_seq1	<i>exportin-1</i> (XP_013181864.1 - <i>Papilio xuthus</i>)
<i>Exportin-5</i>	2	comp65439_c0_seq1; comp74870_c0_seq1	<i>exportin-5</i> (XP_021187744.1 - <i>Helicoverpa armigera</i> ; XP_028161831.1 - <i>Ostrinia furnacalis</i>)
<i>Exportin-6</i>	1	comp98500_c0_seq1	<i>exportin-6</i> (XP_021207588.1 - <i>Bombyx mori</i>)
<i>Chc</i>	3	comp70108_c0_seq1; comp20357_c0_seq1; comp43281_c0_seq1	<i>clathrin heavy chain</i> (XP_028040056.1 - <i>Bombyx mandarina</i> ; XP_022831631.1 - <i>Spodoptera litura</i> ; XP_013184154.1 - <i>Amyelois transitella</i> ; XP_026755155.1 - <i>Galleria mellonella</i>)
Regulação			
<i>Eri-like</i>	1	comp61162_c0_seq1	<i>3'- 5' exoribonuclease 1</i> (XP_028162339.1 - <i>Ostrinia furnacalis</i>)
<i>REase</i>	1		<i>RNAi efficiency-related nuclease REase</i> (AYE20402.1 - <i>Ostrinia furnacalis</i>)
Outros			
<i>Spindle-E</i>	4	comp65674_c0_seq1; comp77746_c0_seq1; comp82121_c0_seq1; comp44623_c0_seq1	<i>probable ATP-dependent RNA helicase spindle-E</i> (XP_013183580.1 - <i>Amyelois transitella</i> ; XP_028166135.1 - <i>Ostrinia furnacalis</i> ; XP_028036705.1 - <i>Bombyx mandarina</i>)
<i>Vig</i>	1	comp63094_c0_seq1	<i>vasa intronic protein</i> (KOB79256.1 - <i>Operophtera brumata</i>)
<i>Fmr-1</i>	1	comp21771_c0_seq1	<i>fragile X mental retardation syndrome-related protein 1</i> (XP_021188739.1 - <i>Helicoverpa armigera</i> ; XP_021208652.1 - <i>Bombyx mori</i>)
<i>MUT-7</i>	1	comp110530_c0_seq1	<i>exonuclease mut-7 homolog</i> (XP_028159293.1 - <i>Ostrinia furnacalis</i>)
<i>Vha16</i>	1	comp63252_c0_seq4	<i>vacuolar H⁺ ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit</i> (NP_001091762.1 - <i>Bombyx mori</i>)

partir do transcriptoma da espécie.

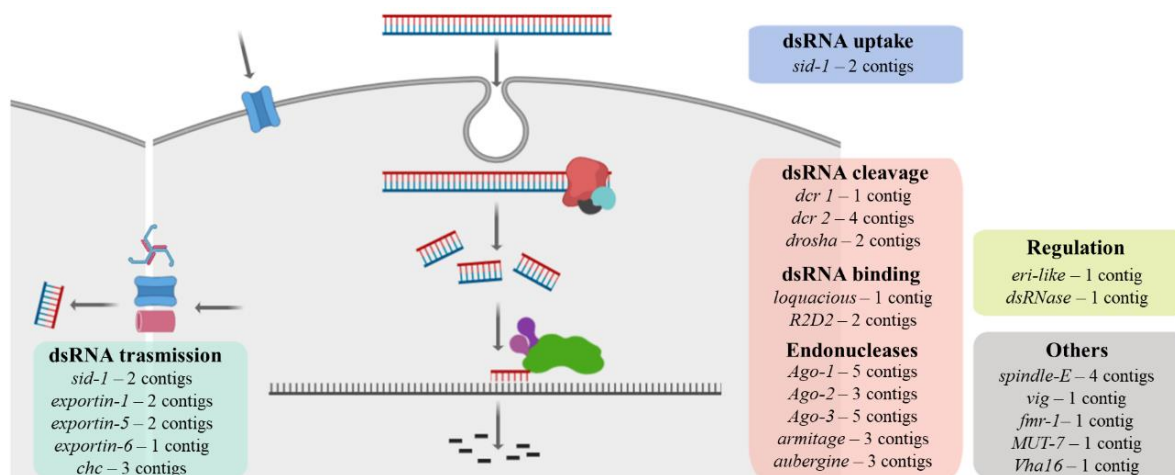


Figura 11. *Contigs* relacionados a genes envolvidos no mecanismo de RNA de interferência em *Diatraea saccharalis* identificados a partir do transcriptoma da espécie. Estrão representados genes correspondentes a vias de absorção, clivagem e ligação a dsRNA, bem como endonucleases, reguladores, elementos de transmissão de dsRNA e outros.

2.3.4 Identificação de potenciais genes-alvos RNAi de *D. saccharalis*: estratégia visando silenciamento de genes envolvidos em rotas de hormônios e resistência a inseticidas

O hormônio juvenil (JH) foi descoberto na década de 1930 como um fator secretado pelo *corpus allatum* e é responsável por inibir a metamorfose dos insetos (Shinoda, 2016). JH regula o desenvolvimento, reprodução, diapausa, polifenismo e comportamento ao longo da vida do inseto. Praticamente todos os tecidos são alvos do JH (*juvenile hormone*) (Shinoda, 2016). Para a via de biossíntese do JH, três *contigs* com alta similaridade ($E < e^{-30}$) com o gene *farnesilpirofosfato fosfatase* (FPPP) foram identificados, um com *farnesol desidrogenase dependente de NADP⁺* e dois com *retinol aldeído desidrogenase*. Já para a via de degradação do JH, dez *contigs* homólogos a *epóxido hidrolase do hormônio juvenil (JHEH)* foram identificados (Figura 12) (ANEXO – Tabela 3).

A entrega artificial de dsRNA correspondente a duas regiões conservadas de um gene, que também está relacionado na via de degradação do JH, o *JHE* de *Bemisia tabaci*, afetou adversamente a sobrevivência e a reprodução desta espécie, conhecida como mosca-branca (Grover *et al.*, 2019a). A alimentação de dsRNA pelas moscas adultas mostrou efeitos adversos na próxima geração de insetos, apresentando menor eclodibilidade dos ovos e período de incubação mais curto (Grover *et al.*, 2019b). Assim como a JHE, a proteína JHEH, que atua em vias de degradação do hormônio juvenil em insetos, foi utilizada como alvo para o silenciamento gênico. Larvas de *T. absoluta*, quando alimentadas em dieta artificial contendo bactérias *Escherichia coli* HT115 expressando dsRNA contra o gene *JHEH*, não apresentaram aumento na taxa de mortalidade quando comparado ao grupo

controle; entretanto, o tratamento com dsRNA contra este gene resultou em níveis reduzidos de transcritos e em um encurtamento da duração do ciclo larval (Bento *et al.*, 2020). A redução significativa no acúmulo de transcritos de *JHEH* em larvas alimentadas em dieta contendo bactérias expressando dsRNA contra *JHEH* em comparação com insetos alimentados com bactérias não transformadas (isto é, sem expressar dsJHEH), foi observada logo após 3 dias de alimentação, levando a uma diminuição de 78,9% no acúmulo relativo de transcritos. Além disso, o dsJHEH causou uma redução de aproximadamente 5 dias na duração do ciclo larval tanto para machos como para fêmeas de *T. absoluta* (Bento *et al.*, 2019). Estes resultados corroboraram para a indicação prévia de genes destas rotas de hormônio como potenciais alvos de silenciamento para o controle via RNAi.

Além do JH, o ecdisônio é outro hormônio importante para o desenvolvimento dos insetos, sendo secretado pela glândula protorácica que, em sua forma ativa, estimula a metamorfose e regula a ecdise nos insetos (Nijhout, 2019). As respostas celulares ao ecdisônio são muito diversas, incluindo desenvolvimento e diferenciação de tecidos adultos, morte celular programada de tecidos larvais destinados a morrer e remodelação de tipos de células neuronais durante a metamorfose (Bender, 2003). No caso da biossíntese do ecdisônio, dois *contigs* foram identificados homólogos ao gene *Neverland* (colesterol desidrogenase); *contigs* homólogos para as enzimas do citocromo P450 codificadas por genes *Halloween* foram detectados, sendo cinco *contigs* homólogos para *spook* (CYP307A), dois para *phantom* (CYP306A1), seis ao *disembodied* (CYP302A1) e um ao *shadow* (CYP315A1). Por fim, um *contig* com similaridade ao *shade* (CYP314A1), enzima P450 que medeia a hidroxilação da ecdisônio no hormônio esteroide 20-hidroxiectidisona para muda de insetos, foi identificado (Figura 12) (ANEXO – Tabela 3).

O uso de genes relacionados a via de biossíntese de ecdisônio já tem demonstrado seu potencial como alvo de silenciamento gênico em insetos. Em *Schistocerca gregaria*, o gene *Halloween spook* (*SPO*), envolvido na produção do metabólito ativo do ecdisteroide, 20-hidroxiectidisona (20E), foi alvo de silenciamento RNAi, resultando em ninfas em ínstares médios e tardios com atraso significativo no desenvolvimento e interferências na ecdise. Os níveis de 20E de ninfas tratadas com dsSPO foram geralmente baixos, sugerindo que a perturbação dos níveis de 20E causou as anormalidades de desenvolvimento citadas (Sugahara *et al.*, 2017). A injeção de RNA de fita dupla referente ao gene *phantom* no estágio larval de *Chilo suppressalis* diminuiu eficientemente seu nível de expressão (Shahzad *et al.*, 2022). O grupo de insetos tratados com dsRNA mostrou concentrações de ecdisteróides significativamente diminuídos, ocasionado atraso no desenvolvimento larval e maior

mortalidade larval (Shahzad *et al.*, 2022). Resultados semelhantes foram documentados para outras espécies de lepidópteros como *Bombyx mori* e *Plutella xylostella*, demonstrando que a regulação negativa de genes *Halloween* pode resultar em maior duração do desenvolvimento, menor pupação, defeitos fenotípicos, bem como mortalidade (Peng *et al.*, 2019; Niwa *et al.*, 2010). Considerando então a importância desses genes envolvidos na biossíntese de ecdisônio, dado o papel essencial que esse hormônio assume na regulação da metamorfose e ecdise dos insetos, esperamos que o conhecimento destes genes identificados a partir do transcriptoma de *D. saccharalis*, possa contribuir para a aplicação prática no manejo deste inseto-praga no cenário do uso do RNAi como ferramenta de controle deste inseto.

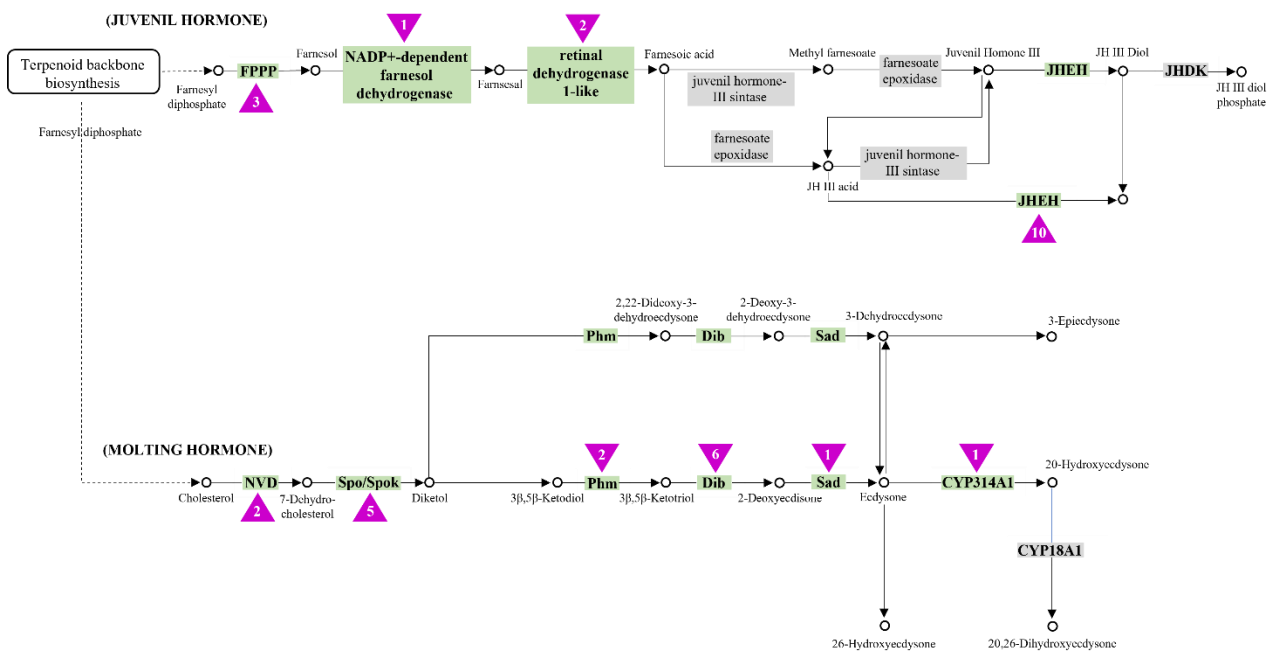


Figura 12. Rota de biossíntese de hormônio juvenil e hormônio ecdisônio em insetos obtida do KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). A análise do transcriptoma de *Diatraea saccharalis* identificou transcritos homólogos que codificam enzimas da via biossintética do hormônio juvenil, incluindo farnesilpirofosfato fosfatase (FPPS), farnesol desidrogenase dependente de NADP + e retinol aldeído desidrogenase; e enzimas para a degradação do hormônio juvenil, como epóxido hidrolase do hormônio juvenil (JHEH), com número de ocorrências identificadas no triângulo roxo em destaque. A análise do transcriptoma também identificou transcritos homólogos que codificam enzimas da via biossintética do hormônio ecdisônio, incluindo colesterol 7-desidrogenase (*Neverland*); e uma série de enzimas do citocromo P450 codificadas pelos genes *Halloween*, como *spook* (CYP307A); *phantom* (CYP306A1); *disembodied* (CYP302A1); *shadow* (CYP315A1); e *shade* (CYP314A1). Novamente, o número de ocorrências de cada contig é apresentado nos triângulos de coloração roxa destacados na imagem. As caixas de enzimas destacadas em verde, são as que possuem contigs relacionados no transcriptoma de *D. saccharalis*. Para as marcadas em cinza, não foram encontrados contigs correspondentes nesta análise.

O controle químico realizado contra *D. saccharalis* hoje é baseado em 58 produtos registrados, distribuídos entre os grupos químicos antranilamida, piretroide, benzoilureia, diamida, neonicotinoide, pirazol, espinosina e diacilhidrazina (AGROFIT, 2022). Considerando o sucesso do uso de genes de rotas de desintoxicação e resistência a inseticidas

dos insetos como alvos para o silenciamento via RNAi buscamos nos dados do transcriptoma de *D. saccharalis*, encontrar genes relacionados a estas rotas. Baseado na revisão publicada por Palli (2020), que apresenta os principais genes que codificam proteínas envolvidas em mecanismo de resistência a inseticidas empregados que tem sido identificados em insetos. Foi descrito que as proteínas e transportadores requeridos para as três fases do metabolismo de inseticidas incluem os citocromos-P450 monooxigenases, glutaciona S-transferases, UDP-glucuronosiltransferases, carboxilesterases e transportadores transmembranas de cassetes de ligação a ATP (transportadores ABC). Os insetos utilizam enzimas de desintoxicação que aumentam a oxidação, epoxidação, desidrogenação, hidrólise ou redução (Fase I), conjugação (Fase II) ou excreção (Fase III) de compostos tóxicos naturais e sintéticos referidos como xenobióticos para proteger a si mesmos da toxicidade exercida por esses produtos químicos. A superexpressão constitutiva ou induzida de genes que codificam enzimas envolvidas na desintoxicação (por exemplo, mono-oxigenases do citocromo P450 [P450s]), conjugação (por exemplo, glutaciona S-transferases [GSTs]), transferências de UDP-glucuronosiltransferases (por exemplo, carboxilesterases) e excreção (por exemplo, transportadores transmembranas de cassetes de ligação a ATP [ABC]) tem sido relatada em insetos que desenvolveram resistência à maioria das classes de inseticidas introduzidos para seu controle (Scott, 1999; Scott, Liu & Wen, 1998). Ademais, estudos realizados em várias espécies de insetos demonstraram via de resposta xenobiótica envolvendo espécies de oxigênio reativas (*reactive oxygen species* [ROS]), fatores de transcrição da família *Cap 'n' colar* (CncC) e fatores de transcrição de aponeurose muscular fibromatose (*muscle aponeurosis fibromatosis* [Maf]) para superexpressão de enzimas e transportadores envolvidos na resistência a inseticidas (Palli, 2020).

Trabalhos recentes em várias espécies de insetos como *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Aphis gossypii*, *Anopheles gambiae*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, *Bactrocera dorsalis* e *Tetranychus cinnabarinus* identificaram membros da superfamília do fator de transcrição CNC - bZIP (por exemplo, CncC) como reguladores de genes que codificam enzimas e transportadores envolvidos na resistência metabólica a inseticidas (Misra *et al.*, 2011; Misra *et al.*, 2013; Kalsi & Palli, 2015; Kalsi & Palli, 2017; Kalsi & Palli, 2017b; Gaddelapati *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2016; Ingham *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2019a; Hu *et al.*, 2019b; Lu *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2017).

Foram identificados genes de *D. saccharalis* relacionados com rotas de resistência a inseticidas e desintoxicação dos insetos. Analisando os dados do transcriptoma de *D.*

saccharalis, foi então possível encontrar três *contigs* relacionados a transportadores de membrana de ligação a ATP (ABC), 14 *contigs* a carboxilesterases, 15 a citocromos P450, 19 a glutathione S-transferases, três a fatores de transcrição da família *Cap 'n' colar* (CncC) e três a Kelch-like ECH proteína 1 (*Keap1 – Kelch-like ECH-associated protein1*) (Figura 13) (ANEXO – Tabela 3). Sabendo que um dos grandes desafios do uso de RNAi para proteção de plantas é a eficácia do silenciamento do gene alvo, seguido pela parada do desenvolvimento e/ou morte do inseto, uma das estratégias consiste em buscar genes funcionais conhecidos ou genes homólogos com base em sequências do genoma / transcriptoma e informações de anotação de genes (Zhang *et al.*, 2013). Logo, a identificação destes genes funcionais relacionados a vias de resistência a inseticidas parece ser uma alternativa para o futuro do controle de *D. saccharalis* via RNAi.

Muitos estudos concentram-se na identificação e validação de genes que codificam proteínas alvos dos inseticidas (acetilcolinesterases, canais iônicos, receptores a proteína de *Bacillus thuringiensis* e outros receptores no sistema nervoso) como alvos de silenciamento gênico em diversas espécies de insetos, com a finalidade de aumentar a sensibilidade dos mesmos aos diversos inseticidas e, assim, facilitar seu controle (Kim *et al.*, 2015). Outros estudos que envolvem a tecnologia RNAi também têm sido desenvolvidos a fim de revelar o papel dos genes que codificam monooxigenases, carboxilesterases e glutathione-S-transferases, e citocromo P450 na desintoxicação e resistência a inseticidas (Kim *et al.*, 2015).

Por exemplo, em *Plutella xylostella*, o nocaute do transcrito *CYP6BG1* envolvido na resistência a permetrina via administração oral de dsRNA levou a uma redução significativa na resistência das larvas alimentadas com dsRNA de *CYP6BG1* 24 e 48 h após exposição à permetrina. Além disso, a alimentação de dsRNA de *CYP6BG1* levou a redução total das atividades P450 (Bautista *et al.*, 2009). Outro gene do citocromo P450, *CYP6AE14*, encontrado em *Helicoverpa armigera*, se caracterizou por permitir que este herbívoro tolere concentrações inibitórias de gossipol no algodão (Mao *et al.*, 2007). No entanto, quando as larvas são alimentadas com material vegetal expressando dsRNA específico para *CYP6AE14*, os níveis desse transcrito no intestino médio do inseto diminuem e o crescimento larval é retardado (Mao *et al.*, 2007). Ambos os efeitos são mais dramáticos na presença de gossipol, beneficiando o controle de *H. armigera* (Mao *et al.*, 2007). De maneira similar, o *knockdown* mediado por RNAi do transcrito *CYP6AE10* pela injeção de dsRNA levou a um aumento da mortalidade de larvas de *Spodoptera exigua* após o tratamento com os produtos lambda-cialotrina e quercetina + lambda-cialotrina (Hafeez *et al.*, 2020). No geral, os dados mostraram que os P450s podem desempenhar um papel importante na adaptação metabólica

das larvas de *S. exigua* aos aleloquímicos de defesa presentes em plantas hospedeiras bem como inseticidas (Hafeez *et al.*, 2020).

Além das proteínas pertencentes à família dos citocromos P450, sabe-se que as carboxilesterases desempenham papéis significativos no metabolismo de compostos xenobióticos em muitas espécies de insetos (Oakeshott *et al.*, 1999; Oakeshott *et al.*, 2010). A expressão de *CarE*, por exemplo é regulada positivamente em adultos de *Aphis gossypii* em cepas resistentes a ometoato e malato, indicando o envolvimento potencial desta proteína carboxilesterase na resistência a inseticidas organofosforados (OP). Gong *et al.* (2014) demonstraram que a expressão de *CarE* em indivíduos resistentes ao ometoato de *A. gossypii* foi dramaticamente suprimida após a ingestão de dsRNA-*CarE*. A atividade da carboxilesterase foi reduzida em pulgões adultos alimentados com dsRNA-*CarE*, em comparação a indivíduos do controle, indicando a supressão da expressão de *CarE* aumentou a suscetibilidade ao ometoato em indivíduos das cepas de pulgões resistentes. A carboxilesterase CarE pode ser considerada, portanto, como um dos principais alvos da resistência ao inseticida organofosforado (OPs) em *A. gossypii*. Além disso, sugeriram que a CarE seria um alvo propício ao controle de pulgões resistente a OPs, e que plantas transgênicas resistentes a estes insetos poderiam ser obtidas através do silenciamento mediado por RNAi da expressão de *CarE* destes insetos (Gong *et al.*, 2014).

Linhas de *Triticum aestivum* transgênicas RNAi expressando dsRNA da carboxilesterase *CbE E4* (linhas dsCbE1-5 e dsCbE2-2) foram desenvolvidas e oferecidas a pulgões *Sitobion avenae* e foi possível observar que a expressão do gene *CbE E4* em *S. avenae* foi significativamente reduzida em até 30-60% (Xu *et al.*, 2014). Posteriormente, o extrato da enzima CbE E4 obtida de larvas *S. avenae* alimentadas em plantas dsCbE1-5 e dsCbE2-2 foi responsável por hidrolisar apenas 20 a 30% da solução do inseticida Phoxim em 40 min, enquanto o extrato obtido de insetos alimentados em plantas controle hidrolisou 60% de solução de Phoxim no mesmo período (Xu *et al.*, 2014). Portanto, o silenciamento deste gene carboxilesterase de pulgões pelo uso de RNAi mediado por plantas prejudicou consideravelmente a tolerância de *S. avenae* a Phoxim.

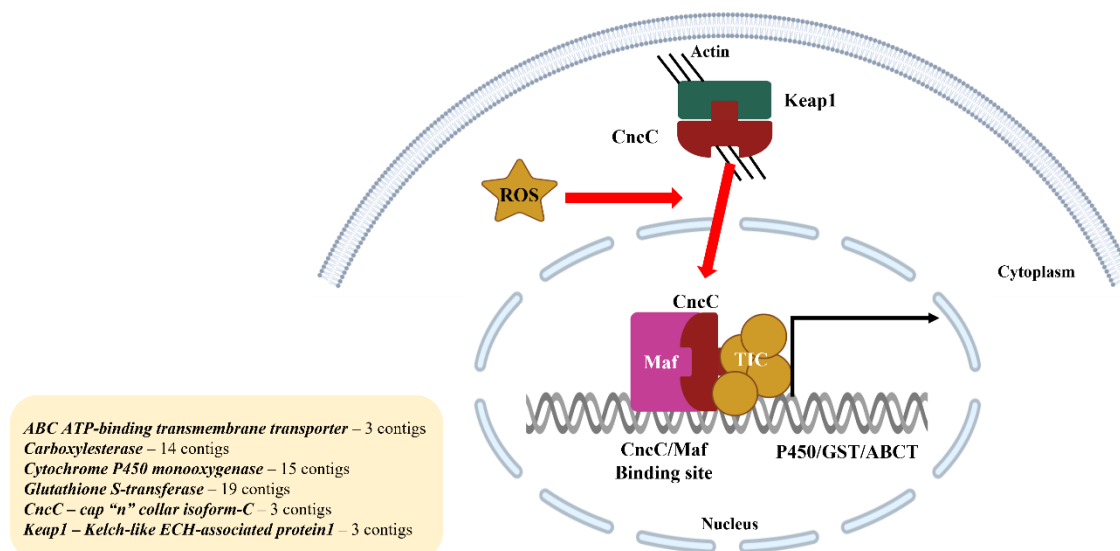


Figura 13. Modelo para a regulação CncC e Maf dos genes de resposta xenobiótica em insetos, adaptado de Palli (2020). CncC heterodimeriza com Keap1 e permanece no citoplasma ancorado aos filamentos de actina. Sob condições de estresse xenobiótico, espécies reativas de oxigênio (ROS) ou outras moléculas induzem a dissociação de CncC e Keap1, permitindo que CncC se transloque para o núcleo e se heterodimerize com Maf. O heterodímero se liga aos elementos de resposta CncC / Maf localizados no promotor de genes de resposta xenobiótica e induzem sua expressão. ABCT, transportadores ABC transmembranas de cassete de ligação ATP; CncC, fatores de transcrição da família Cap 'n' collar; GST, glutathione S-transferases; Keap1, Kelch-like ECH proteína 1; Maf, aponeurose muscular fibromatose; P450, monooxigenases do citocromo P450; ROS, espécies de oxigênio reativo; TIC, complexo de iniciação de transcrição. No quadro destacado à esquerda, estão apresentados os contigs encontrados para um dos respectivos genes a partir da análise do transcriptoma de *Diatraea saccharalis*.

2.3.5 Identificação de potenciais genes-alvos RNAi de *D. saccharalis*: estratégia visando emprego de método de entrega de dsRNA via alimentação

Entre os principais desafios que o controle de insetos-praga por RNAi enfrenta está a diferença da eficiência a resposta ao RNAi entre as diversas ordens de insetos. Hoje sabe-se que a ineficiência de RNAi é influenciada por diversos fatores, como degradação do dsRNA, absorção celular do dsRNA, transporte intercelular e intracelular dessas moléculas, processamento de dsRNA em siRNA e a formação do complexo RISC (Zhu *et al.*, 2019). Sabendo-se que o método de entrega de dsRNA via alimentação /oral / ingestão representa o método de escolha, e que a captação de dsRNA pelas células epiteliais do intestino médio do inseto é fundamental para a eficácia da resposta do RNAi nestes casos, identificamos, a partir do sequenciamento e montagem do transcriptoma, alguns genes-alvos de *D. saccharalis* que estão relacionados ao trato digestivo do inseto e que podem compreender uma classe interessante de alvos para silenciamento gênico via RNAi para este inseto. A captação de dsRNA pelas células epiteliais do intestino médio dos insetos é fundamental para a eficácia da resposta ao RNAi. Após a chegada do dsRNA à superfície da membrana intestinal, as células epiteliais devem captar os dsRNAs da membrana intestinal e transmiti-los ao mecanismo de

RNAi intracelular (Joga *et al.*, 2016). Assim, ao ingerir as moléculas de dsRNA juntamente com o alimento, as mesmas serão absorvidas pelas células do intestino, atingindo o alvo rapidamente e provavelmente contribuindo para um efeito de silenciamento mais robusto.

No entanto, se forem selecionados genes expressos em outros tecidos do inseto, a probabilidade das moléculas de dsRNAs os atingirem é mais reduzida, visto que podem sofrer degradação por nucleases presentes no próprio trato digestivo, na hemolinfa, ou pela ação do pH alcalino do intestino, antes de alcançarem o tecido onde o gene-alvo está de fato sendo expresso (Terenius *et al.*, 2011). Daí a opção da escolha de genes-alvos que se sejam expressos em tecidos relacionados ao trato digestivo dos insetos que se buscam controlar. A partir, então, do sequenciamento e montagem do transcriptoma de *D. saccharalis*, pudemos identificar três genes desta classe: *aper-1*, que codifica a proteína peritrofina-1 (ou peritrofina A); o gene que é responsável pela produção da proteína mucina intestinal de insetos; e o gene relacionado com uma proteína carboxipeptidase do intestino médio.

O intestino médio da maioria dos insetos é revestido por uma membrana peritrófica semipermeável (MP), uma estrutura que otimiza a digestão dos insetos, separando processos ectoperitróficos, catalisados por enzimas digestivas luminiais, de processos endoperitróficos no espaço entre as células epiteliais da MP e do intestino médio, catalisados por enzimas como as aminopeptidases luminiais e microvilares (Terra, 1990; Terra, 2001; Bolognesi *et al.*, 2008; Hegedus *et al.*, 2009). A MP também protege o epitélio do intestino médio dos danos oxidativos (Barbehenn & Stannard, 2004; Summers & Felton, 1996), de toxinas como as de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Rees *et al.*, 2009) e dos aleloquímicos das plantas (Barbehenn, 2001), excluindo sua absorção. As MPs podem ser classificadas em dois tipos, dependendo de serem secretadas por todo o epitélio do intestino médio (Tipo I) ou pela cárdia (Tipo II), um órgão próximo à junção ante-intestino médio (Bolognesi *et al.*, 2008; Harper & Hopkins, 1997; Hegedus *et al.*, 2009). A distensão do intestino após a ingestão de alimentos é o estímulo para a nova formação de MP tipo I, um processo que envolve uma quitina sintase B específica para o intestino médio, e peritrofinas secretadas pelas células do intestino (Bolognesi *et al.*, 2008). As peritrofinas são proteínas integrais e fortemente ligadas à MP dos insetos, que interagem diretamente com as estruturas das fibrilas de quitina através dos domínios de ligação à quitina (CBDs) e só podem ser liberadas da MP por desnaturantes fortes. A multimerização de proteínas, ou seja, as interações peritrofina-peritrofina, contribui com o aumento da complexidade espacial e a estabilidade estrutural da MP (Toprak *et al.*, 2010; Tellam *et al.*, 1999). O papel do MP na homeostasia intestinal é de particular interesse e vários estudos forneceram justificativa para a MP como um local-alvo para o controle de

insetos. Como o intestino médio do inseto próximo do local da entrada do dsRNA, o potencial dos genes do intestino médio como alvos para RNAi também foi investigado, incluindo genes envolvidos na síntese de MP (Arakane *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2006; Rodríguez-Cabrera *et al.*, 2010; Toprak *et al.*, 2013; Agrawal *et al.*, 2014; Kelkenberg *et al.*, 2015).

Quando realizamos o BLASTx do gene predito *aper-1* de *D. saccharalis* (contig “comp63154_c0_seq”: 252 nucleotídeos; 84 aminoácidos), obtivemos elevada similaridade com a proteína peritrophin A-like de *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera) (GenBank: AWI47792.1) (Rodríguez-de la Noval *et al.*, 2019), com identidade de 78% (Figura 14).

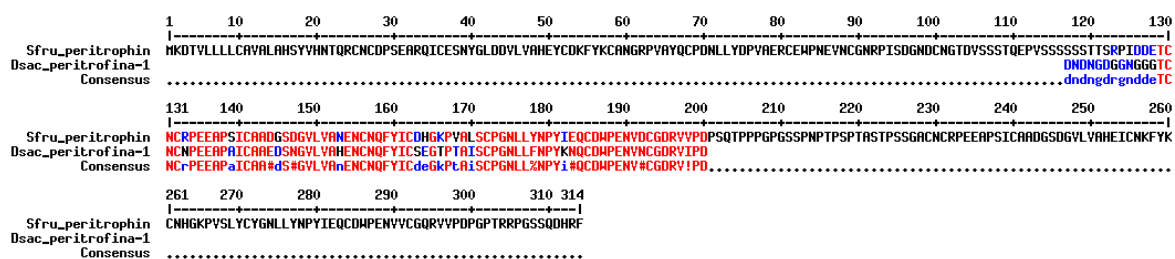


Figura 14. Alinhamento da sequência proteica peritrofina-1 de *Diatraea saccharalis* (contig: “comp63154_c0_seq”) e de *Spodoptera frugiperda* (AWI47792.1).

A análise funcional desta sequência revelou ainda a presença do domínio característico, o domínio de ligação à quitina (*Chitin binding domain*) (IP002557), encontrado (entre outros) nas proteínas de ligação à quitina peritrofina-A, particularmente nas proteínas da matriz peritrófica de insetos e quitinases de animais (Shen *et al.*, 1998; Elvin *et al.*, 1996; Casu *et al.*, 1997).

Além disso, a sequência proteica em questão foi caracterizada como pertencente à família PTHR23301: *chitin binding peritrophin-a* e superfamília homóloga IPR036508: *Chitin binding domain superfamily*. Esta entrada representa uma superfamília do domínio de ligação à quitina. É encontrada (entre outras) nas proteínas de ligação à quitina, peritrofina-A, proteínas particulares da matriz peritrófica de insetos e quitinases animais. Trata-se de um domínio extracelular que contém seis cisteínas conservadas que provavelmente formam três pontes de dissulfeto. Por fim, foi possível realizar a atribuição dos seguintes termos GO à sequência da peritrofina-1 de *D. saccharalis*: *chitin binding* (GO:0008061); *chitin metabolic process* (GO:0006030) e *extracellular region* (GO:0005576).

A proteína mucina intestinal de insetos (*Insect intestinal mucin - IIM*), por sua vez, possui uma relação muito próxima com as peritrofinas. O número de peritrofinas

caracterizadas até o momento é limitado, mas é suficiente para permitir a subdivisão delas de acordo com a ausência ou presença de domínios altamente glicosilados, pois esse recurso confere propriedades exclusivas a essas proteínas (Hegedus *et al.*, 2009). No primeiro caso, isto é, quando há ausência de domínios glicosilados, dizemos que se trata de peritrofinas não-mucinas. Já no segundo, ou seja, na presença de domínios altamente glicosilados (regiões ricas em resíduos de treonina e serina), dizemos que são mucinas intestinais de invertebrados (Hegedus *et al.*, 2009).

As IIMs podem desempenhar funções como lubrificar a passagem de alimentos pelo intestino médio e proteger o epitélio intestinal da invasão de patógenos (Wang & Granados, 1997a; Tellam *et al.*, 1999; Sarauer *et al.*, 2003). As IIMs já foram descritas em lepidópteros (Wang e Granados, 1997b; Shi *et al.*, 2004), dípteros (Shen *et al.*, 1999; Tellam *et al.*, 2000; Shao *et al.*, 2005) e coleópteros (Venancio *et al.*, 2009) e são mais frequentemente associados à PM, mas ocasionalmente à membrana microvilar (Shen *et al.*, 1999) ou a ambas (Theopold *et al.*, 1996; Korayem *et al.*, 2004).

O transcrito encontrado no transcriptoma de *D. saccharalis* correspondente à proteína IIM, cujo número de identificação é “comp63248_c0_seq5”, compreende uma sequência parcial de 1020 pb. Os 340 aminoácidos codificados a partir desta região possuem 89,7% de identidade com a sequência da proteína mucina intestinal de *Plutella xylostella* (Lepdoptera) (GenBank: AAN63949.1) (Figura 15).

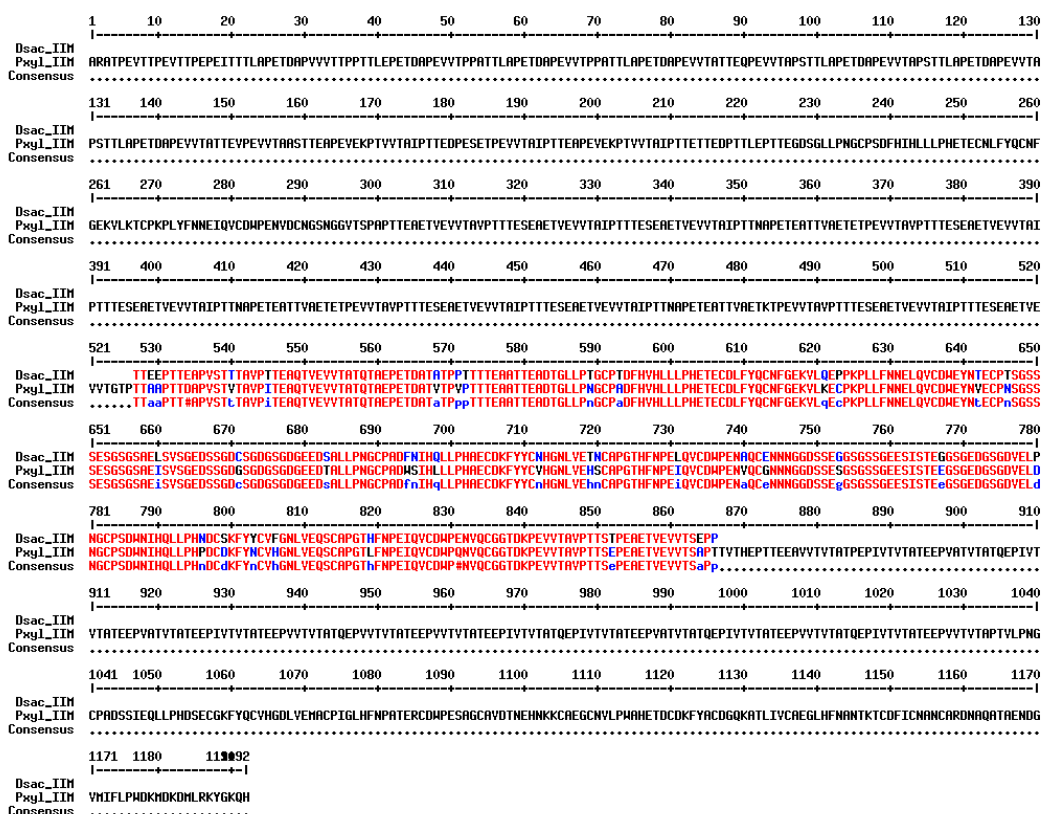


Figura 15. Alinhamento da sequência proteica mucina instestinal de *Diatraea saccharalis* (Dsac_IIM) e *Plutella xylostella* (Pxul_IIM) (GenBank: AAN63949.1).

Esta proteína se caracterizou por possuir o mesmo domínio típico que a proteína anterior (peritrofina-1), isto é, o domínio tipo 2 de ligação à quitina (CHIT_BIND_II) (PS50940: *Chitin-binding type-2 domain*). Sua classificação quanto à família foi como pertencente à superfamília homóloga IPR036508: *Chitin binding domain superfamily*. A ela também foram atribuídos os seguintes termos GO: *chitin binding* (GO:0008061), *chitin metabolic process* (GO:0006030) e *extracellular region* (GO:0005576). Para comprovar sua classificação como mucina, foi feita uma análise de presença de sítios glicosilados, utilizando a ferramenta NetNGlyc 1.0 Server, já que a subdivisão de acordo com a ausência (peritrofinas não-mucinas) ou presença (mucinas intestinais invertebradas) de domínios altamente glicosilados é suficiente para essa distinção entre as duas proteínas, pois esse recurso confere propriedades exclusivas a essas proteínas (Hegedus *et al.*, 2009). Foram encontrados 3 sítios N-glyc presumíveis ao longo da cadeia de aminoácidos desta proteína (Figura 16).

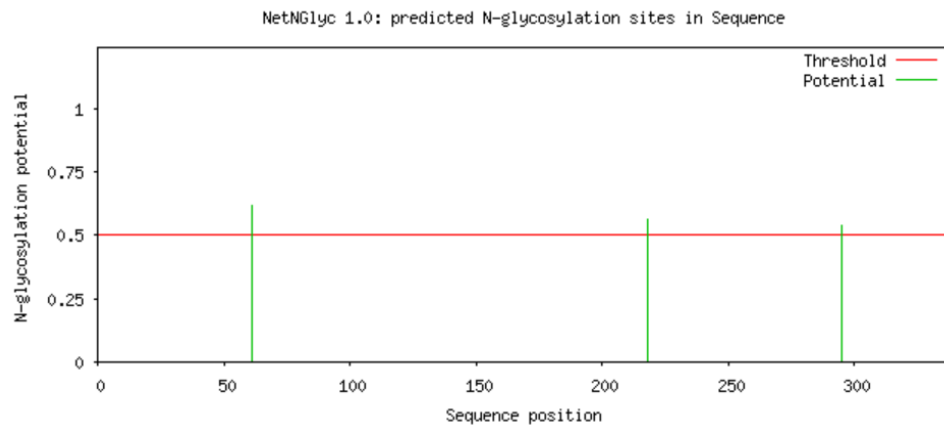


Figura 16. Predição de sítios glicosilados (N-glyc) ao longo da cadeia da proteína mucina intestinal (IIM) de *Diatraea saccharalis*, através da ferramenta NetNGlyc 1.0 Server.

No que diz respeito ao uso do gene que codifica a proteína mucina intestinal como alvo RNAi em insetos, alguns relatos já descreveram sua potencialidade para controle de lepidópteros. Lagartas neonatas de *Helicoverpa armigera* e *Plutella xylostella*, após alimentação com dsRNA contra o gene IIM (dsIIM) causaram uma redução de 2,8 e 2,3 vezes, respectivamente, nos transcritos, quando comparado ao tratamento controle (Israni & Rajam, 2017). A ingestão de dsIIM ocasionou melanização nas lagartas de *P. xylostella*, que se tornou aparente no segundo instar e que se manteve até o estágio de pupa (Israni & Rajam, 2017), além de atraso no crescimento larval em relação aos insetos controle. Já em *H. armigera*, a alimentação com dsIIM levou à uma mortalidade média de 50%, a qual se iniciou logo no segundo instar e se manteve até os ínstaes finais do inseto. Assim como em *P. xylostella*, as lagartas também apresentaram melanização. daquelas que sobreviveram e se tornaram pupas, 20% morreram neste estágio (Israni & Rajam, 2017).

O terceiro gene encontrado de *D. saccharalis* relacionado ao trato digestivo codifica uma proteína carboxipeptidase intestinal, especificamente uma metalocarboxipeptidase. Em animais, a digestão de proteínas da dieta é realizada pela degradação inicial de proteínas em peptídeos por endopeptidases, seguida por degradação adicional em peptídeos e aminoácidos menores por exopeptidases. As exopeptidases incluem aminopeptidases e carboxipeptidases. As aminopeptidases removem resíduos de aminoácidos do terminal amino (NH_4^+) dos peptídeos do substrato, enquanto as carboxipeptidases removem resíduos de aminoácidos da extremidade carboxila (COO^-) dos peptídeos do substrato (Terra *et al.*, 1996).

As carboxipeptidases digestivas são metalopeptidases, ou seja, requerem um íon metálico divalente, como o Zn^{2+} para suas atividades (Rawlings, 1998). Com base no entendimento das carboxipeptidases de sistemas de mamíferos, as carboxipeptidases digestivas podem ser classificadas em dois tipos: carboxipeptidase A e carboxipeptidase B.

Ambas pertencem à família das peptidases M14 (Auld, 1998; Aviles & Vendrell, 1998). Enquanto a carboxipeptidase A tem uma especificidade para os resíduos terminais carboxílicos aromáticos e hidrofóbicos, a carboxipeptidase B é preferencialmente específica para os resíduos de aminoácidos básicos. A maioria das carboxipeptidases do intestino médio de insetos estudadas em detalhes até o momento pertence às ordens Diptera e Lepidoptera (Ferreira *et al.*, 2015).

O gene que codifica esta proteína foi alvo de RNAi para o controle de *Nilaparvata lugens*, quando Zha *et al.* (2011) produziram plantas de arroz expressando dsRNA contra o gene da carboxipeptidase altamente expresso no intestino médio. Quando as ninfas do inseto foram alimentadas em plantas de arroz expressando dsRNA contra *Nlcar*, os níveis de transcrição do gene alvo foram reduzidos significativamente no intestino médio. Os resultados de RT-qPCR revelaram que os transcritos após a ingestão reduziram em 43,3% logo no segundo dia após a alimentação.

O transcrito de *D. saccharalis* correspondente à carboxipeptidase (“comp57519_c0_seq1”) possui 963 nucleotídeos, codificando então uma sequência proteica de 321 aminoácidos. Ao alinhar esta sequência de aminoácidos com demais carboxipeptidases de outras espécies de insetos foram encontradas similaridades elevadas, tais como 71,1% de identidade com a carboxipeptidase de *Operophtera brumata* (Lepidoptera) (Uniprot: A0A0L7LK89); 71,3% de identidade com a carboxipeptidase de *Manduca sexta* (Lepidoptera) (Genbank: XP_030023351.1); e 69,1% de identidade com a carboxipeptidase de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera) (GenBank: CAF25190.1) (Figura 17).

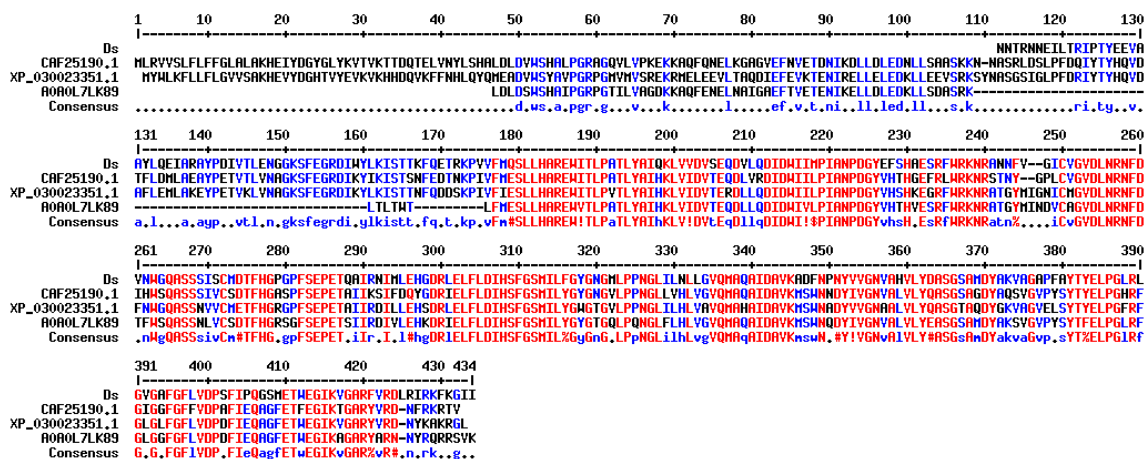


Figura 17. Alinhamento da sequência proteica carboxipeptidase de *Diatraea saccharalis* (Ds) com demais sequências de carboxipeptidases de *Operophtera brumata* (A0A0L7LK89), *Helicoverpa armigera* (CAF25190.1) e *Manduca sexta* (XP_030023351.1), todos representantes da ordem Lepidoptera.

Também foi possível prever o domínio característico da proteína carboxipeptidase de *D. saccharalis*: trata-se do domínio Peptidase M14, carboxipeptidase A (IPR000834). De acordo com a descrição encontrada para este domínio, mais de 70 famílias de metalopeptidases foram identificadas até o momento. Nessas enzimas, um cátion divalente que geralmente é zinco, mas pode ser cobalto, manganês ou cobre, ativa a molécula de água (Rawlings & Barrett, 1995). Em algumas famílias de metalopeptidases co-catalíticas, dois íons metálicos são observados em estruturas cristalinas ligadas por cinco aminoácidos, com um aminoácido ligando os dois íons metálicos. Muitas metaloproteases contêm um motivo HEXXH, que foi demonstrado em estudos cristalográficos como parte do local de ligação do metal (Rawlings & Barrett, 1995). Este grupo de sequências contém uma gama diversificada de famílias de genes, que incluem metalopeptidases pertencentes à família MEROPS peptidase M14 (carboxipeptidase). A família da carboxipeptidase A pode ser subdividida ainda em quatro subfamílias: M14A (carboxipeptidase A ou digestiva), M14B (carboxipeptidase H ou reguladora), M14C (gama-D-glutamil-L-diaminoácido peptidase I) e M14D (AGTPBP-1 / Nna1 tipo proteínas) (Kalinina *et al.*, 2007).

A proteína carboxipeptidase de *D. saccharalis* foi classificada como membro da família PTHR11705: *protease family m14 carboxypeptidase a,b*. Também foram encontrados sítios de ligação ao Zn nas posições 46 (resíduo H), 49 (resíduo E), 100 (resíduo R), 117 (resíduo N) e 169 (resíduo H), compreendendo justamente o motivo HEXXH, característico de metaloproteases, demonstrado por estudos cristalográficos como parte do local de ligação do metal, como já citado acima. Por fim, foi realizada a atribuição de termos GO à sequência proteica, que resultou em *metallocarboxypeptidase activity* (GO:0004181); *carboxypeptidase activity* (GO:0004180); *zinc ion binding* (GO:0008270) e; *proteolysis* (GO:0006508).

2.4. Conclusões

A análise do transcriptoma do desenvolvimento de *D. saccharalis* dos estágios de ovo até o 6º instar larval permitiu a obtenção de 15.5951 *contigs* obtidos e 6.620 genes diferencialmente expressos (*differentially expressed genes* - DEG) entre os estágios de desenvolvimento, os quais foram classificados em oito *clusters* de padrões de expressão. A validação expressão diferencial destes DEGs via RT-qPCR demonstrou que, para todos 16 DEGs selecionados, dois de cada *cluster*, o padrão de expressão correspondia ao obtido no RNA-seq, atestando a confiabilidade dos dados. A partir do transcriptoma, pudemos identificar os genes relacionados à maquinaria central de RNAi em *D. saccharalis*, que atuam nos mais diversos processos como absorção e transmissão celular de dsRNA, ligação ao

dsRNA, corte do dsRNA, regulação e outros. Além disso, potenciais genes-alvo para o silenciamento gênico de *D. saccharalis* via RNAi foram encontrados, envolvidos com rotas de biossíntese e degradação do JH, biossíntese do ecdisônio, resistência a inseticidas e desintoxicação dos insetos e relacionados ao trato digestivo do inseto. Considerando que o RNAi tem um enorme potencial para uso em estratégias de manejo de pragas de insetos, mas que diversos obstáculos e desafios necessitam ser superados para viabilizar sua implementação, sendo a escolha do gene-alvo um dos fatores de maior relevância para otimização desta eficiência, o trabalho desenvolvido neste capítulo oferece diretrizes para identificação de genes-alvos que sugerem ser altamente eficazes para uso em estratégias do manejo de *D. saccharalis* baseado em RNAi.

Referências

- Agrawal, S., Kelkenberg, M., Begum, K., Steinfeld, L., Williams, C. E., Kramer, K. J., ... & Merzendorfer, H. (2014). Two essential peritrophic matrix proteins mediate matrix barrier functions in the insect midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 49, 24-34.
- Ai, X., Wei, Y., Huang, L., Zhao, J., Wang, Y., & Liu, X. (2018). Developmental control of *Helicoverpa armigera* by ingestion of bacteria expressing dsRNA targeting an arginine kinase gene. *Biocontrol Science and Technology*, 28, 253-267.
- Alamalakala, L., Parimi, S., Patel, N., & Char, B. (2018). Insect RNAi: integrating a new tool in the crop protection toolkit. *Trends in Insect Molecular Biology and Biotechnology*, 193-232.
- Andrade, E. D., & Hunter, W. B. (2016). RNA interference–natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC). In: Abdurakhmonov IY (ed) RNA interference. InTech, Croatia, pp 391–409.
- Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Specht, C. A., Tomoyasu, Y., Lorenzen, M. D., ...& Beeman, R. W. (2005). The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Molecular Biology*, 14, 453-463.
- Auld, D.S., 1998. Carboxypeptidase A. In: Barrett, A. J., Woessner, J. F., & Rawlings, N. D. (Eds.). (2012). *Handbook of proteolytic enzymes* (Vol. 1). Elsevier.
- Aviles, F.X., Vendrell, J., 1998. Carboxypeptidase B. In: Barrett, A. J., Woessner, J. F., & Rawlings, N. D. (Eds.). (2012). *Handbook of proteolytic enzymes* (Vol. 1). Elsevier.
- Ramos, A., Mahowald, A., Jacobs-Lorena, M., 1993. Gut-specific genes from the black fly *Simulium vittatum* coding trypsin-like and carboxypeptidase-like proteins. *Insect Molecular Biology*, 1, 149–163.
- Barbehenn, R. V. (2001). Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 47, 86-99.
- Barbehenn, R. V.; Stannard, J. (2004). Antioxidant defense of the midgut epithelium by the peritrophic envelope in caterpillars. *Journal of Insect Physiology*. 50, 783-90.
- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., ... & Roberts, J. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature biotechnology*, 25, 1322-1326.

- Bautista, M. A. M., Miyata, T., Miura, K., & Tanaka, T. (2009). 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*, 39, 38-46.
- Bellés, X. (2010). Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annual Review of Entomology*, 55, 111-128.
- Bender, M. (2003). Ecdysone action in insect development. In: Henry, H.L., Norman, A.W. (Eds.), *Encyclopedia of Hormones*, Vol. 1. Academic Press, 438–446.
- Bento, F. M. M., Marques, R. N., Campana, F. B., Demétrio, C. G., Leandro, R. A., Parra, J. R. P., & Figueira, A. (2020). Gene silencing by RNAi via oral delivery of dsRNA by bacteria in the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *Pest Management Science*, 76, 287-295.
- Bolognesi, R., Terra, W. R., & Ferreira, C. (2008). Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency: theoretical and experimental models. *Journal of Insect Physiology*, 54, 1413-1422.
- Botelho, P. S. M., & Macedo, N. (2002). *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. *Controle Biológico no Brasil: Parasitoides e Predadores*. Manole, Sao Paulo, 409-426.
- Box, H. E. (1931). The crambine genera *Diatraea* and *Xanthopherne* (Lep., Pyral.). *Bulletin of Entomological Research*, 22, 1-50.
- Camargo, R. D. A., Herai, R. H., Santos, L. N., Bento, F. M., Lima, J. E., Marques-Souza, H., & Figueira, A. (2015). De novo transcriptome assembly and analysis to identify potential gene targets for RNAi-mediated control of the tomato leafminer (*Tuta absoluta*). *BMC Genomics*, 16, 635.
- Casu, R., Eisemann, C., Pearson, R., Riding, G., East, I., Donaldson, A., ... & Tellam, R. (1997). Antibody-mediated inhibition of the growth of larvae from an insect causing cutaneous myiasis in a mammalian host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 8939-8944.
- Cruz, I. (2007). A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em milho, no Brasil. *Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.
- dos Santos, L. B., Viana, J. P. G., Francischini, F. J. B., Fogliata, S. V., Joyce, A. L., de Souza, A. P., ... & Zucchi, M. I. (2020). A first draft genome of the Sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *F1000Research*, 9, 1269.
- Dyar, H. G., & Heinrich, C. (1927). The American moths of the genus *Diatraea* and allies. *Proceedings of the United States National Museum*, 71, 1-48.
- Elvin, C. M., Vuocolo, T., Pearson, R. D., East, I. J., Riding, G. A., Eisemann, C. H., & Tellam, R. L. (1996). Characterization of a Major Peritrophic Membrane Protein, Peritrophin-44, from the Larvae of *Lucilia cuprina*: cDNA and deduced amino acid sequences. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 8925-8935.
- Fahrbach, S. E., Nambu, J. R., & Schwartz, L. M. (2012). Programmed cell death in insects. *Insect Molecular Biology and Biochemistry*, 419-449.
- Felton, G. W., & Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29, 187-197.
- Ferreira, C., Rebola, K. G. O., Cardoso, C., Bragatto, I., Ribeiro, A. D. F., & Terra, W. R. (2015). Insect midgut carboxypeptidases with emphasis on S 10 hemipteran and M 14 lepidopteran carboxypeptidases. *Insect Molecular Biology*, 24, 222-239.
- Flynn, J. L., Reagan, T. E., & Ogunwolu, E. O. (1984). Establishment and damage of the sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae) in corn as influenced by plant development. *Journal of Economic Entomology*, 77, 691-697.

- Gaddelapati, S. C., Kalsi, M., Roy, A., & Palli, S. R. (2018). Cap'n'collar C regulates genes responsible for imidacloprid resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 99, 54-62.
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., ... & Hornik, K. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*, 5, R80.
- Gong, Y. H., Yu, X. R., Shang, Q. L., Shi, X. Y., & Gao, X. W. (2014). Oral delivery mediated RNA interference of a carboxylesterase gene results in reduced resistance to organophosphorus insecticides in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *PloS one*, 9, e102823.
- Gordon, K. H., & Waterhouse, P. M. (2007). RNAi for insect-proof plants. *Nature Biotechnology*, 25, 1231-1232.
- Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J., ... & Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*, 36, 3420-3435.
- Gridley, T. (1997). Notch signaling in vertebrate development and disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 9, 103-108.
- Grover, S., Jindal, V., & Banta, G. (2019a). RNA interference mediated knockdown of juvenile hormone esterase gene in *Bemisia tabaci* (Gennadius): Effects on adults and their progeny. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22, 56-62.
- Grover, S., Jindal, V., Banta, G., Taning, C. N. T., Smagghe, G., & Christiaens, O. (2019b). Potential of RNA interference in the study and management of the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 100, e21522.
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., ... & MacManes, M. D. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8, 1494.
- Hafeez, M., Qasim, M., Ali, S., Yousaf, H. K., Waqas, M., Ali, E., ... & Wang, M. (2020). Expression and functional analysis of P450 gene induced tolerance/resistance to lambda-cyhalothrin in quercetin fed larvae of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27, 77-87.
- Harper, M. S., & Hopkins, T. L. (1997). Peritrophic membrane structure and secretion in European corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*). *Tissue and Cell*, 29, 463-475.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., & Toprak, U. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology*, 54, 285-302.
- Hernández-Soto, A., & Chacón-Cerdas, R. (2021). RNAi crop protection advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 12148.
- Hu, B., Hu, S., Huang, H., Wei, Q., Ren, M., Huang, S., ... & Su, J. (2019a). Insecticides induce the co-expression of glutathione S-transferases through ROS/CncC pathway in *Spodoptera exigua*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 155, 58-71.
- Hu, B., Huang, H., Wei, Q., Ren, M., Mburu, D. K., Tian, X., & Su, J. (2019b). Transcription factors CncC/Maf and AhR/ARNT coordinately regulate the expression of multiple GSTs conferring resistance to chlorpyrifos and cypermethrin in *Spodoptera exigua*. *Pest management science*, 75, 2009-2019.
- Huvenne, H., & Smagghe, G. (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of Insect Physiology*, 56, 227-235.
- Ingham, V. A., Pignatelli, P., Moore, J. D., Wagstaff, S., & Ranson, H. (2017). The transcription factor Maf-S regulates metabolic resistance to insecticides in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*, 18, 1-11.

- Israni, B.; Rajam, M. V. (2017). Silencing of ecdysone receptor, insect intestinal mucin and sericotropin genes by bacterially produced double-stranded RNA affects larval growth and development in *Plutella xylostella* and *Helicoverpa armigera*. *Insect Molecular Biology*, 6, 164–180.
- Joga, M. R., Zotti, M. J., Smagghe, G., & Christiaens, O. (2016). RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. *Frontiers in Physiology*, 7, 553.
- Kalinina, E., Biswas, R., Berezniuk, I., Hermoso, A., Aviles, F. X., & Flicker, L. D. (2007). A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases. *The FASEB Journal*, 21, 836-850.
- Kalsi, M., & Palli, S. R. (2015). Transcription factors, CncC and Maf, regulate expression of CYP6BQ genes responsible for deltamethrin resistance in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 65, 47-56.
- Kalsi, M., & Palli, S. R. (2017a). Cap n collar transcription factor regulates multiple genes coding for proteins involved in insecticide detoxification in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 90, 43-52.
- Kalsi, M., & Palli, S. R. (2017b). Transcription factor cap n collar C regulates multiple cytochrome P450 genes conferring adaptation to potato plant allelochemicals and resistance to imidacloprid in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 83, 1-12.
- Kato, N., Mueller, C. R., Fuchs, J. F., Wessely, V., Lan, Q., & Christensen, B. M. (2006). Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 1-9.
- Katoch, R., Sethi, A., Thakur, N., & Murdock, L. L. (2013). RNAi for insect control: current perspective and future challenges. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 847-873.
- Kaur, R., Choudhury, A., Chauhan, S., Ghosh, A., Tiwari, R., & Rajam, M. V. (2021). RNA interference and crop protection against biotic stresses. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27, 2357-2377.
- Kelkenberg, M., Odman-Naresh, J., Muthukrishnan, S., & Merzendorfer, H. (2015). Chitin is a necessary component to maintain the barrier function of the peritrophic matrix in the insect midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 56, 21-28.
- Kim, Y. H., Issa, M. S., Cooper, A. M., & Zhu, K. Y. (2015). RNA interference: applications and advances in insect toxicology and insect pest management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 120, 109-117.
- Kodrík, D., Bednářová, A., Zemanová, M., & Krishnan, N. (2015). Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects - an update. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 25788-25816.
- Korayem, A. M., Fabbri, M., Takahashi, K., Scherfer, C., Lindgren, M., Schmidt, O., ... & Theopold, U. (2004). A *Drosophila* salivary gland mucin is also expressed in immune tissues: evidence for a function in coagulation and the entrapment of bacteria. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 1297-1304.
- Lawrence, P. (1975). The cell cycle and cellular differentiation in insects. In *Cell Cycle and Cell Differentiation* (pp. 111-121). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Liu, F., Wang, X. D., Zhao, Y. Y., Li, Y. J., Liu, Y. C., & Sun, J. (2015). Silencing the HaAK gene by transgenic plant-mediated RNAi impairs larval growth of *Helicoverpa armigera*. *International Journal of Biological Sciences*, 11, 67.
- Lu, K., Cheng, Y., Li, W., Li, Y., Zeng, R., & Song, Y. (2020). Activation of CncC pathway by ROS burst regulates cytochrome P450 CYP6AB12 responsible for λ -cyhalothrin tolerance in *Spodoptera litura*. *Journal of Hazardous Materials*, 387, 121698.

- Mao, Y. B., Cai, W. J., Wang, J. W., Hong, G. J., Tao, X. Y., Wang, L. J., ... & Chen, X. Y. (2007). Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25, 1307-1313.
- Mao, Y. B., Cai, W. J., Wang, J. W., Hong, G. J., Tao, X. Y., Wang, L. J., ... & Chen, X. Y. (2007). Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25, 1307-1313.
- Merlin, B. L., & C onsoli, F. L. (2019). Regulation of the larval transcriptome of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) by maternal and other factors of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Frontiers in physiology*, 10, 1106.
- Misra, J. R., Horner, M. A., Lam, G., & Thummel, C. S. (2011). Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. *Genes & Development*, 25, 1796-1806.
- Misra, J. R., Lam, G., & Thummel, C. S. (2013). Constitutive activation of the Nrf2/Keap1 pathway in insecticide-resistant strains of *Drosophila*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 43, 1116-1124.
- Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A. C., & Kanehisa, M. (2007). KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Research*, 35, W182-W185.
- Myers, J. G. (1932). The original habitat and hosts of three major sugar-cane pests of tropical America (*Diatraea*, *Castnia* and *Tomaspis*). *Bulletin of Entomological Research*, 23, 257-271.
- Nijhout, H. F. (2019). Neural Control of Postphylotypic Development.
- Niwa, R., Namiki, T., Ito, K., Shimada-Niwa, Y., Kiuchi, M., Kawaoka, S., ... & Shinoda, T. (2010). Non-molting glossy/shroud encodes a short-chain dehydrogenase/reductase that functions in the 'Black Box' of the ecdysteroid biosynthesis pathway. *Development*, 137, 1991-1999.
- Noriega, D. D., Arraes, F. B., Antonino, J. D., Macedo, L. L., Fonseca, F. C., Togawa, R. C., ... & Grossi-de-Sa, M. F. (2020). Comparative gut transcriptome analysis of *Diatraea saccharalis* in response to the dietary source. *PLoS One*, 15, e0235575.
- Oakeshott, J. G., Claudianos, C., Russell, R. J., & Robin, G. C. (1999). Carboxyl/cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multigene family. *Bioessays*, 21, 1031-1042.
- Oakeshott, J., Claudianos, C., Campbell, P. M., Newcomb, R. D., & Russell, R. (2010). Biochemical genetics and genomics of insect esterases. *Comprehensive Molecular Insect Science*, 5.
- Oliveira, C. M., Auad, A. M., Mendes, S. M., & Frizzas, M. R. (2014). Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. *Crop Protection*, 56, 50-54.
- Palli, S. R. (2020). CncC/Maf-mediated xenobiotic response pathway in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 104, e21674.
- Peng, L., Wang, L., Zou, M. M., Vasseur, L., Chu, L. N., Qin, Y. D., ... & You, M. S. (2019). Identification of *halloween* genes and RNA interference-mediated functional characterization of a *Halloween* gene *Shadow* in *Plutella xylostella*. *Frontiers in Physiology*, 1120.
- Peng, T., Pan, Y., Gao, X., Xi, J., Zhang, L., Yang, C., ... & Shang, Q. (2016). Cytochrome P450 CYP6DA2 regulated by cap 'n' collar isoform C (CncC) is associated with gossypol tolerance in *Aphis gossypii* Glover. *Insect Molecular Biology*, 25, 450-459.
- Qi, X. L., Su, X. F., Lu, G. Q., Liu, C. X., Liang, G. M., & Cheng, H. M. (2015). The effect of silencing arginine kinase by RNAi on the larval development of *Helicoverpa armigera*. *Bulletin of Entomological Research*, 105, 555-565.
- Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (1995). Evolutionary families of metallopeptidases. In: *Methods in Enzymology* (Vol. 248, pp. 183-228). Academic Press.

- Rawlings, N.D., 1998. Introduction: clan MC containing metallo-carboxypeptidases. In: Barrett, A. J., Woessner, J. F., & Rawlings, N. D. (Eds.). (2012). Handbook of proteolytic enzymes (Vol. 1). Elsevier.
- Rees, J. S., Jarrett, P., & Ellar, D. J. (2009). Peritrophic membrane contribution to Bt Cry δ -endotoxin susceptibility in Lepidoptera and the effect of Calcofluor. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100, 139-146.
- Rodríguez-Cabrera, L., Trujillo-Bacallao, D., Borrás-Hidalgo, O., Wright, D. J., & Ayra-Pardo, C. (2010). RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. *Environmental Microbiology*, 12, 2894-2903.
- Rodríguez-de la Noval, C., Rodríguez-Cabrera, L., Izquierdo, L., Espinosa, L. A., Hernandez, D., Ponce, M., ... & Ayra-Pardo, C. (2019). Functional expression of a peritrophin A-like SfPER protein is required for larval development in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Scientific Reports*, 9, 1-14.
- Rodríguez-del-Bosque, L. A., Smith Jr, J. W., & Browning, H. W. (1988). Bibliography of the neotropical cornstalk borer, *Diatraea lineolata* (Lepidoptera: Pyralidae). *Florida Entomologist*, 176-186.
- Rybczynski, R., & Gilbert, L. I. (1995). Prothoracicotropic hormone elicits a rapid, developmentally specific synthesis of β tubulin in an insect endocrine gland. *Developmental Biology*, 169, 15-28.
- Rybczynski, R., & Gilbert, L. I. (1998). Cloning of a β 1 tubulin cDNA from an insect endocrine gland: Developmental and hormone-induced changes in mRNA expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 141, 141-151.
- Sarauer, B. L., Gillott, C., & Hegedus, D. (2003). Characterization of an intestinal mucin from the peritrophic matrix of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Molecular Biology*, 12, 333-343.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3, 1101-1108.
- Scott, J. G. (1999). Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 757-777.
- Scott, J. G., Liu, N., & Wen, Z. (1998). Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 121, 147-155.
- Shahzad, M. F., Idrees, A., Afzal, A., Iqbal, J., Qadir, Z. A., Khan, A. A., ... & Li, J. (2022). RNAi-Mediated Silencing of Putative *Halloween* Gene *Phantom* Affects the Performance of Rice Striped Stem Borer, *Chilo suppressalis*. *Insects*, 13, 731.
- Shao, L., Devenport, M., Fujioka, H., Ghosh, A., & Jacobs-Lorena, M. (2005). Identification and characterization of a novel peritrophic matrix protein, Ae-Aper50, and the microvillar membrane protein, AEG12, from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 947-959.
- Shen, Z., & Jacobs-Lorena, M. (1998). A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin: cloning, expression, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 17665-17670.
- Shen, Z., Dimopoulos, G., Kafatos, F. C., & Jacobs-Lorena, M. (1999). A cell surface mucin specifically expressed in the midgut of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 5610-5615.
- Zhao, S., & Fernald, R. D. (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology*, 12, 1047-1064.

- Shi, L., Wang, M., Zhang, Y., Shen, G., Di, H., Wang, Y., & He, L. (2017). The expression of P450 genes mediating fenpropathrin resistance is regulated by CncC and Maf in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 198, 28-36.
- Shi, X., Chamankhah, M., Visal-Shah, S., Hemmingsen, S. M., Erlandson, M., Braun, L., ... & Hegedus, D. D. (2004). Modeling the structure of the type I peritrophic matrix: characterization of a *Mamestra configurata* intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 1101-1115.
- Shinoda, T. (2016). Juvenile Hormone. In *Handbook of Hormones* (pp. 564-599). Academic Press.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., ... & Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, 107, 465-476.
- Sluss, H. K., Han, Z., Barrett, T., Davis, R. J., & Ip, Y. T. (1996). A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes & Development*, 10, 2745-2758.
- Sugahara, R., Tanaka, S., & Shiotsuki, T. (2017). RNAi-mediated knockdown of *SPOOK* reduces ecdysteroid titers and causes precocious metamorphosis in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Developmental Biology*, 429, 71-80.
- Summers, C. B., & Felton, G. W. (1996). Peritrophic envelope as a functional antioxidant. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 32, 131-142.
- Tang, G. H., Xiong, Y., Liu, Y., Song, Z. H., Yang, Y., Shen, G. M., ... & Jiang, H. B. (2019). The Transcription factor mafB regulates the susceptibility of *Bactrocera dorsalis* to abamectin via GSTz2. *Frontiers in Physiology*, 10, 1068.
- Tellam, R. L., Wijffels, G., & Willadsen, P. (1999). Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 87-101.
- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J. S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., ... & Bebas, P. (2011). RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 57, 231-245.
- Terra, W. R. (1990). Evolution of digestive systems of insects. *Annual review of entomology*, 35, 181-200.
- Terra, W. R. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 47, 47-61.
- Terra, W. R., Ferreira, C., Jordão, B. P., Dillon, R. J. (1996). Digestive enzymes. In: Mark J. Lehane, & Billingsley, P. F. (1996). *Biology of the insect midgut*. Chapman and Hall.
- Theopold, U., Samakovlis, C., Erdjument-Bromage, H., Dillon, N., Axelsson, B., Schmidt, O., ... & Hultmark, D. (1996). Helix pomatia lectin, an inducer of *Drosophila* immune response, binds to hemomucin, a novel surface mucin. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 12708-12715.
- Toprak, U., Baldwin, D., Erlandson, M., Gillott, C., Harris, S., & Hegedus, D. D. (2013). In vitro and in vivo application of RNA interference for targeting genes involved in peritrophic matrix synthesis in a lepidopteran system. *Insect Science*, 20, 92-100.
- Toprak, U., Erlandson, M., & Hegedus, D. (2010). Peritrophic matrix proteins. *Trends in Entomology*, 6, 23-51.

- Turner, C. T., Davy, M. W., MacDiarmid, R. M., Plummer, K. M., Birch, N. P., & Newcomb, R. D. (2006). RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology*, 15, 383-391.
- UK, C. (1989). *Diatraea saccharalis*. [Distribution map]. Distribution Maps of Plant Pests, (December (Revised)).
- Ulrich, J., Dao, V. A., Majumdar, U., Schmitt-Engel, C., Schwirz, J., Schultheis, D., ... & Bucher, G. (2015). Large scale RNAi screen in *Tribolium* reveals novel target genes for pest control and the proteasome as prime target. *BMC Genomics*, 16, 1-9.
- Venancio, T. M., Cristofolletti, P. T., Ferreira, C., Verjovski-Almeida, S., & Terra, W. R. (2009). The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. *Insect Molecular Biology*, 18, 33-44.
- Wang, P., & Granados, R. R. (1997a). An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 6977-6982.
- Wang, P., & Granados, R. R. (1997b). Molecular cloning and sequencing of a novel invertebrate intestinal mucin cDNA. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 16663-16669.
- Wang, Y. R., Wang, Y. Z., Wang, W. Z., Wang, R., & Gao, S. J. (2018). RNA interference of tubulin genes has lethal effects in *Mythimna separate*. *Gene*, 670, 1-6.
- Wang, Y., Zhang, H., Li, H., & Miao, X. (2011). Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *PloS One*, 6, e18644.
- Whitten, M. M., Facey, P. D., Del Sol, R., Fernández-Martínez, L. T., Evans, M. C., Mitchell, J. J., ... & Dyson, P. J. (2016). Symbiont-mediated RNA interference in insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283, 20160042.
- Willow, J., Taning, C. N. T., Cook, S. M., Sulg, S., Silva, A. I., Smagghe, G., & Veromann, E. (2021). RNAi targets in agricultural pest insects: advancements, knowledge gaps, and IPM. *Frontiers in Agronomy*, 3, 99.
- Wilson, B. E., VanWeelden, M. T., Beuzelin, J. M., Reagan, T. E., & Prado, J. A. (2017). Efficacy of insect growth regulators and diamide insecticides for control of stem borers (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane. *Journal of Economic Entomology*, 110, 453-463.
- Wilson, M. J., McKelvey, B. H., van der Heide, S., & Dearden, P. K. (2010). Notch signaling does not regulate segmentation in the honeybee, *Apis mellifera*. *Development Genes and Evolution*, 220, 179-190.
- Xu, L., Duan, X., Lv, Y., Zhang, X., Nie, Z., Xie, C., ... & Liang, R. (2014). Silencing of an aphid carboxylesterase gene by use of plant-mediated RNAi impairs *Sitobion avenae* tolerance of Phoxim insecticides. *Transgenic Research*, 23, 389-396.
- Yu, N., Christiaens, O., Liu, J., Niu, J., Cappelle, K., Caccia, S., ... & Smagghe, G. (2013). Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect Science*, 20, 4-14.
- Zha, W. J., Peng, X. X., Chen, R. Z., Du, B., Zhu, L. L., & He, G. C. (2011). Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the Hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PloS One*, 6, e20504.
- Zhang, H., Li, H. C., & Miao, X. X. (2013). Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. *Insect science*, 20, 15-30.
- Zhang, J., Khan, S. A., Heckel, D. G., & Bock, R. (2017). Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection. *Trends in Biotechnology*, 35, 871-882.
- Zhao, S. & Fernald, R. D. (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology*, 12, 1047-1064.
- Zhu, K. Y., & Palli, S. R. (2019). Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference. *Annual Review of Entomology*, 65.

Zhu, L., Yin, T. Y., Sun, D., Liu, W., Zhu, F., Lei, C. L., & Wang, X. P. (2017). Juvenile hormone regulates the differential expression of putative juvenile hormone esterases via methoprene-tolerant in non-diapause-destined and diapause-destined adult female beetle. *Gene*, 627, 373-378.

Anexo

Tabela 1. Primers de RT-qPCR e tamanho de amplicons esperados para os genes de *Diatraea saccharalis* utilizados na validação da expressão diferencial dos transcritos observada na análise do transcriptoma da espécie.

Cluster	Gene	Sequência do primer 5' - 3'	Amplicon (pb)
1	<i>Tubulin alpha chain</i>	CCTTCACCTTCGGCGGAGTC AAGCGTGCCTTCGTACATTGGTA	131
1	<i>Arginine kinase</i>	GGGCGTAGATTCCAACACCAGA AGACCTCCTTCGGCTCAACAC	81
2	<i>Juvenile hormone esterase</i>	CCCTGTATATCGGTGGCAACTAAC CGCAAGGATTGTTTCATAGGATGGG	107
2	<i>Tubulin beta chain</i>	ACTGGTGAAGGTATGGATGAAATG TAGTTGCTTCTTGGTATTGTTGGT	94
3	<i>Larval cuticle protein LCP-22</i>	TACTTGGTTGTATTGGCTGCTCTAC CGTGGTGGTGAGTTGGGAAC	104
3	<i>Acetyl-CoA carboxylase</i>	GGTGGCTTTCTCTCATCCTCT ACTCCTCTATCTTTGCTGGGTC	101
4	<i>Arylphorin subunit alpha</i>	ATAGATCATAACAGTGCTTCGGCTTG GAGGTAGTGTCAACATTCTTCTCGT	118
4	<i>Arylphorin subunit beta</i>	CTCTCCAGGTCTTCGTCGCT GGTATCCCAAAGGTTTCTCATCCAA	99
5	<i>Cytochrome b5</i>	CTGATTGCGGGATTTAAGCTCTTCT ACCACACATTTGACATTTCTCTTTGG	139
5	<i>Carboxypeptidase D</i>	GGTATGAAGTGTAGGACGGTTGTT TGATGGGCAGTTTCTATGGTTCTC	139
6	<i>Chitinase A</i>	GGTCGATTACAACGCAGCACAA GCCACTCAGGAGCATACAAAGAAG	122
6	<i>Lachesin</i>	GAGCATCCACCATAACATCATAACA ATTAAGTTGACACATATACCAGCCC	130
7	<i>Circadian clock-controlled protein</i>	GAGAGAGACGGACGGACATACTTG GTAAGACTGCGTTGCTGTTGTGTAG	109
7	<i>Fatty acid synthase</i>	CATAGATGCTACGAAATACACCTCCA ACACTCCAGAAGAGATCAGAGAGAA	111
8	<i>Endochitinase</i>	ACGAGGACCCAAAGAGTGTTGAAA GATAGCCCAAGTCATAGCACCCAA	80
8	<i>Apolipoporphins</i>	GGTCCACGCCAGGTTTACTC GTGCTCTGTATTTGTTGTCGTTGT	83

Tabela 2. Análise da eficiência dos primers desenhados para validação da expressão diferencial dos genes do transcriptoma de *Diatraea saccharalis* via RT-qPCR, utilizando a plataforma Miner (Zhao & Fernald, 2005).

Cluster	Gene	Transcrito ID	Eficiência (%)
1	<i>Tubulin alpha chain</i>	48806	81.457
	<i>Arginine kinase</i>	47322	80.293
2	<i>CTP synthase</i>	40745	82.347
	<i>Juvenile hormone esterase</i>	43718	85.699
3	<i>Larval cuticle protein LCP-22</i>	45727	82.832
	<i>Acetyl-CoA carboxylase</i>	52614	83.412
4	<i>Arylphorin subunit alpha</i>	47385	82.189
	<i>Arylphorin subunit beta</i>	49658	80.077
5	<i>Cytochrome b5</i>	44567	85.123
	<i>Carboxypeptidase D</i>	52801	87.519
6	<i>Chitinase A</i>	47949	81.328
	<i>Lachesin</i>	52478	85.003
7	<i>Circadian clock-controlled protein</i>	43175	82.869
	<i>Fatty acid synthase</i>	50760	82.861
8	<i>Endochitinase</i>	50766	85.443
	<i>Apolipoporphins</i>	52920	85.047

Tabela 3. Identificação dos *contigs* encontrados para rotas de hormônios e resistência a inseticida e desintoxicação de *Diatraea saccharalis*, a partir do transcriptoma da espécie.

	Gene homólogo	Contigs ID
Rotas de Hormônios	<i>farnesilpivofosfato fosfatase (FPPP)</i>	comp26291_c0_seq1; comp42359_c0_seq1; comp44709_c0_seq1
	<i>farnesol desidrogenase dependente de NADP⁺</i>	comp62061_c0_seq4
	<i>retinol aldeído desidrogenase</i>	comp63335_c0_seq4; comp60326_c0_seq2
	<i>epóxido hidrolase do hormônio juvenil (JHEH)</i>	comp50005_c0_seq1; comp59076_c0_seq1; comp59232_c0_seq1; comp59880_c0_seq1; comp62314_c0_seq1; comp63163_c0_seq1; comp63297_c0_seq1; comp70679_c0_seq1; comp20426_c0_seq2; comp29208_c0_seq1
	<i>Neverland (colesterol desidrogenase)</i>	comp32558_c0_seq1; comp42130_c0_seq1
	<i>spook</i>	comp49999_c1_seq1; comp54172_c0_seq2; comp96479_c0_seq1; comp22853_c1_seq1; comp103217_c0_seq1
	<i>phantom</i>	comp16962_c0_seq1; comp44336_c0_seq1
	<i>disembodied</i>	comp18421_c0_seq1; comp25366_c0_seq1; comp43346_c0_seq1; comp45190_c0_seq1; comp51998_c0_seq1; comp63359_c0_seq2
	<i>shadow</i>	comp76709_c0_seq1
	<i>shade</i>	comp11604_c0_seq1
Resistência a inseticidas e desintoxicação	<i>ABC ATP-binding transmembrane transporter</i>	comp54629_c0_seq1; comp104851_c0_seq1; comp24929_c0_seq1 comp36124_c0_seq1; comp13343_c0_seq1; comp55094_c0_seq1; comp59030_c0_seq2; comp61467_c0_seq1; comp65463_c0_seq1; comp66589_c0_seq1; comp67228_c0_seq1; comp68740_c0_seq1; comp70920_c0_seq1; comp17808_c0_seq1; comp81319_c0_seq1; comp18026_c0_seq1; comp19989_c0_seq1
	<i>carboxilesterase</i>	comp62627_c0_seq1; comp91476_c0_seq1; comp63076_c0_seq7; comp44336_c0_seq2; comp61715_c0_seq4; comp111493_c0_seq1; comp28848_c0_seq1; comp63636_c0_seq1; comp53266_c0_seq1; comp85628_c0_seq1; comp92119_c0_seq1; comp63078_c0_seq6; comp48588_c0_seq1; comp71816_c0_seq1; comp63078_c0_seq5
	<i>citrocromos P450</i>	comp34404_c0_seq1; comp42808_c0_seq1; comp50283_c0_seq1; comp54573_c0_seq1; comp60486_c0_seq1; comp60490_c0_seq1; comp60982_c0_seq1; comp61048_c0_seq3; comp61352_c0_seq1; comp61589_c0_seq1; comp62415_c0_seq2; comp62681_c0_seq1; comp62990_c0_seq1; comp63324_c0_seq1; comp63428_c0_seq4; comp17840_c0_seq1; comp18530_c0_seq2; comp94889_c0_seq1 comp108226_c0_seq1
	<i>glutaciona S-transferases</i>	
	<i>CncC – cap “n” collar</i>	comp64271_c0_seq1; comp70012_c0_seq1; comp21188_c0_seq1
	<i>Keap1 – Kelch-like ECH-associated protein1</i>	comp44258_c0_seq1; comp53129_c0_seq1; comp53129_c0_seq2; comp21169_c0_seq2

3. ENTREGA DE DSRNA PARA LAGARTAS DE *Diatraea saccharalis* EMPREGANDO BACTÉRIAS *Escherichia coli* HT115 (DE3)

Resumo

A técnica de RNAi tem sido desenvolvida para o silenciamento gênico e o consequente controle de diversos insetos-pragas, correspondendo a uma estratégia inovadora que pode auxiliar no manejo de importantes pragas agrícolas. Os insetos da ordem Lepidoptera são reconhecidos por apresentarem recalcitrância à técnica de silenciamento utilizando dsRNA. Assim, ajustes devem ser feitos aos métodos de entrega de dsRNA para que haja estabilidade da molécula até atingir o mRNA alvo de silenciamento no inseto. O método de entrega de dsRNA expresso por microrganismos apresenta vantagens como o fato de ser menos trabalhoso, de fácil execução e mais aplicável ao manejo de pragas de insetos do ponto de vista prático. Com isso, buscamos validar a entrega de RNA dupla-fita (dsRNA) para lagartas de *Diatraea saccharalis* empregando bactérias *Escherichia coli* HT115 (DE3) transformadas para expressar dsRNA contra genes-alvo do inseto. Foram avaliados, por meio da metodologia de dieta artificial, volumes crescentes de suspensão bacteriana expressando dsRNA (50 µL, 65 µL, 80 µL e 100 µL), doses de dsRNA (100x, 250x e 500x) e modos de adição (na superfície ou misturada à dieta) da bactéria transformada com o vetor de silenciamento pL4440 para expressar dsRNA contra os genes-alvo *chitina sintase CHI* e *juvenile hormone epoxide hydrolase JHEH*. A partir da avaliação dos parâmetros biológicos (duração da fase larval, mortalidade larval e peso de pupas), não houve evidências de efeitos de silenciamento gênico, presumindo-se que, tal como ocorre na maioria dos insetos da ordem Lepidoptera, *D. saccharalis* apresenta recalcitrância aos mecanismos de RNAi.

Palavras-chave: Inseto-praga, RNA de interferência; Silenciamento gênico

Abstract

The RNAi technique has been developed for gene silencing and the consequent control of several insect pests, corresponding to an innovative strategy that can help manage critical agricultural pests. Insects of the order Lepidoptera are recognized for showing recalcitrance to the silencing technique using dsRNA. Thus, adjustments must be made to the dsRNA delivery methods in order that the molecule is stable until reaching the target mRNA for silencing in the insect. The delivery method of dsRNA expressed by microorganisms has advantages such as the fact that it is less labor intensive, easy to perform, and more applicable to insect pest management from a practical point of view. Thus, we seek to validate the delivery of double-stranded RNA (dsRNA) to *Diatraea saccharalis* caterpillars using *Escherichia coli* HT115 (DE3) bacteria transformed to express dsRNA against insect target genes. It was teste different volumes (50 µL, 65 µL, 80 µL, and 100 µL), dsRNA doses (100x, 250x, and 500x), and modes of addition (on the surface or mixed to the diet) of the transformed bacteria with the silencing vector pL4440 expressing dsRNA against the target genes *CHI* and *JHEH*. From the evaluation of biological parameters (duration of the larval stage, larval mortality, and pupae weight), there was no evidence of gene silencing effects, assuming that, as in most insects of the order Lepidoptera, the species *D. saccharalis* shows recalcitrance to RNAi mechanisms.

Keywords: Gene silencing; Insect pest; RNA Interference.

3.1. Introdução

O mecanismo de interferência por RNA (RNAi) é uma ferramenta eficaz para a determinação da função gênica e também é uma tecnologia emergente para fornecer abordagens para o controle de pragas e doenças na agricultura e silvicultura (Xu *et al.*, 2016, Goodfellow *et al.*, 2019, Vogel *et al.*, 2019). No entanto, as aplicações de RNAi no controle de insetos-praga são limitadas devido a dificuldades na entrega de dsRNA estáveis (Goodfellow *et al.*, 2019). Vários métodos têm sido testados ou aplicados na entrega de dsRNA a espécies de insetos (Joga *et al.*, 2016; Nandety *et al.*, 2015; Palli, 2014; Yu *et al.*, 2013). Os métodos básicos de entrega de dsRNA incluem microinjeção, alimentação e imersão. Nos últimos anos, no entanto, várias tecnologias foram desenvolvidas e incorporadas a esses métodos, incluindo a entrega assistida por lipossomas catiônicos ou nanopartículas, mediado por simbiontes e mediado por plantas transgênicas (Zhu *et al.*, 2020).

A abordagem original para a entrega de dsRNA é a microinjeção, na qual uma pequena quantidade de dsRNA em uma solução apropriada é injetada diretamente em um embrião ou no corpo de inseto (Joga *et al.*, 2016; Palli, 2014; Yu *et al.*, 2013). As vantagens da microinjeção incluem a entrega imediata e direta de uma quantidade conhecida de dsRNA no corpo do inseto em vários estágios de desenvolvimento ou mesmo para partes específicas do corpo (Shi *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2008). Este método também pode evitar as barreiras estruturais, como o tegumento ou epitélio intestinal, que impedem a penetração de dsRNA e que são encontrados por outros métodos de entrega, como aplicações tópicas, imersão ou alimentação. Por outro lado, a microinjeção representa um método que demanda prática e tempo, sendo, portanto, mais desafiador, particularmente devido ao pequeno tamanho do corpo de insetos (Zhu *et al.*, 2020). Sua utilização está limitada em estudos funcionais de genes.

Outro método original de entrega é alimentar os insetos com uma dieta contendo dsRNA sintético ou expresso por microrganismos, também conhecida como entrega oral (Yu *et al.*, 2013). Este método é menos trabalhoso, é de fácil execução e mais aplicável ao manejo de pragas de insetos (Zhu *et al.*, 2020). A interferência de RNA mediada por bactérias (bmRNAi) refere-se ao método de entrega em que bactérias vivas expressando dsRNA são fornecidas a um organismo para produzir e facilitar a absorção de dsRNA *in situ*, resultando no *knock-down* de RNAi do gene-alvo (Goodfellow *et al.*, 2019).

Entre as vantagens do método de entrega de dsRNA expresso por bactérias está o fato de que é significativamente mais econômico do que a produção de dsRNA *in vitro*, particularmente para análise de função gênica e aplicações de controle de pragas (Fraser *et al.*,

2000; Solis *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019). Além disso, a produção em larga escala de bactérias que expressam dsRNA para uso como pesticida, pode ser viável. A entrega persistente e em larga escala de dsRNA é necessária para controlar um inseto praga e também para reduzir o desenvolvimento de resistência (Huvenne & Smagghe, 2010). Os pesticidas de dsRNA expressos por bactérias podem ser pulverizados em culturas a qualquer momento devido à facilidade de produzir grandes quantidades de bactérias que expressam dsRNAs. Além disso, assim como outras estratégias exógenas, o bmRNAi não pode ser silenciado através da metilação do DNA dirigida por RNA (Goodfellow *et al.*, 2019). Um outro sistema baseado na expressão de dsRNA em simbiontes também causaram silenciamento em insetos de forma duradoura e sistêmica (Whitten *et al.*, 2016).

A mediação bacteriana como uma tecnologia de entrega exógena apresenta também a vantagem de ser parcialmente resistente à degradação do dsRNA pelo hospedeiro antes de induzir efeito (Goodfellow *et al.*, 2019). Essa característica torna o bmRNAi adequado como substituto para o *host-induced gene silencing* (HIGS) – um processo baseado em RNAi onde o dsRNA homólogo a um gene do organismo alvo pode ser expresso em uma planta para induzir o silenciamento direcionado do gene do mesmo (Goodfellow *et al.*, 2019). Embora plantas transgênicas nucleares expressando dsRNAs direcionados contra genes essenciais de insetos possam reduzir o crescimento e a aptidão de insetos pragas, a proteção total das plantas e a morte eficiente dos insetos não foram ainda alcançadas (Baum *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2007; Goodfellow *et al.*, 2019). A razão disso é que os dsRNAs expressos a partir do genoma nuclear são alvos da própria maquinaria de RNAi da planta e eficientemente processados em siRNAs pelas endoribonucleases Dicer codificadas no genoma da planta (Gordon & Waterhouse, 2007). Além do mais, demonstrou-se que dsRNAs longos são gatilhos muito mais eficazes de silenciamento de genes por RNAi ambiental em insetos do que siRNAs (He *et al.*, 2020). Uma alternativa tem sido a expressão de dsRNA no genoma plastidial das plantas (plantas transplastômicas), já que os plastídeos não expressam proteínas da maquinaria RNAi e, portanto, acumulam longas moléculas de dsRNA. Contudo, as bactérias de entrega da mesma forma, uma vez esgotadas de RNases de fitas-dupla, ou seja, RNase III, também são capazes de acumular e compartimentalizar o RNA silenciador (Gan *et al.*, 2010). Isso impede o processamento do dsRNA antes da entrada no organismo alvo desejado, permitindo assim uma montagem mais eficiente de RISCs pelo alvo (Goodfellow *et al.*, 2019).

Inicialmente, uma *Escherichia coli* recombinante foi projetada para produção de dsRNAs com o gene RNase III nocauteado (HT115 DE3) e usada para alimentar

Caenorhabditis elegans de forma a analisar a expressão de todos os genes do nematoide (Timmons *et al.*, 2001; Kamath *et al.*, 2003). Em insetos, a mesma estratégia foi aplicada em *Leptinotarsa decemlineata*, que foram alimentados com *E. coli* visando a análise de cinco genes. Esta *E. coli* deficiente em RNAase III foi então usada para a produção de dsRNA; após *L. decemlineata* ter ingerido a bactéria, foram observadas mortalidade e perda de peso corporal significativas (Zhu *et al.*, 2011).

Mais recentemente, uma empresa de biotecnologia desenvolveu uma tecnologia chamada Apse RNA Containers™ (ARCs) (empresa RNAgri) que permite a produção em massa de dsRNA encapsulado usando bactérias (Joga *et al.*, 2016). Plasmídeos que codificam proteínas de ocorrência natural, como capsídeos são co-transformados com outro plasmídeo que codifica sequências de dsRNA mais um *packing site* ("local de empacotamento"). Enquanto as bactérias crescem em cultura, elas produzem subunidades de proteínas que se automontam em torno do dsRNA na célula. Após a purificação das bactérias, o RNA resultante é ambientalmente estável e um produto pronto para pulverização.

O uso de bactérias simbiotes também se mostrou uma estratégia de entrega promissora. O RNAi mediado por simbiotes é uma estratégia intrigante na qual a relação entre bactérias intestinais simbióticas cultiváveis e os hospedeiros pode ser explorada para produzir constitutivamente dsRNA para induzir RNAi no hospedeiro. O RNAi mediado por simbiotes é uma tecnologia versátil para estudar a função do gene e também como biopesticida para controlar a população de pragas. Whitten *et al.* (2016) relataram que as bactérias recombinantes ingeridas (*Rhodococcus rhodnii* LMG5362 e *BFo2*) competiram com sucesso com a microflora selvagem nos insetos *Rhodnius prolixus* e *Frankliniella occidentalis*, respectivamente. Neste trabalho, os autores projetaram cassetes de expressão de dsRNA adequados para actinobactérias e proteobactérias de *R. prolixus* e *F. occidentalis*, respectivamente. A transformação das bactérias deficientes em RNaseIII com um plasmídeo produtor de dsRNA permitiu a síntese estável de moléculas específicas de dsRNA, penetração nas células do intestino do inseto e iniciação de RNAi. *R. prolixus* recebeu dsRNA direcionado ao gene *Vg*, que codifica vitelogenina, uma proteína crítica para a oogênese, resultando em redução de 72% nas taxas de eclosão de ovos postos por indivíduos infectados. Em *F. occidentalis*, eles visaram a α -tubulina, produzindo um fenótipo de mortalidade significativo em indivíduos larvais e adultos (Whitten *et al.*, 2016).

Assim, diversos estudos sobre RNAi mediado por bactérias já validaram sua relação custo-benefício na exploração da função genética e potencial significativo para aplicações agrícolas (Solis *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2016; Goodfellow *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019;

Wang *et al.*, 2021). Esta abordagem de RNAi mediado por bactérias apesar de compreender um método de entrega altamente eficaz para RNAi em muitos coleópteros (Baum *et al.*, 2007; Khajuria *et al.*, 2015; Palli, 2014; Rangasamy *et al.*, 2012), pode resultar em baixa eficiência de RNAi em muitas espécies de insetos, principalmente da ordem Lepidoptera. Em *L. migratoria*, por exemplo, a eficiência de RNAi é alta se o dsRNA for entregue por injeção, mas extremamente baixa se for entregue via alimentação (Song *et al.*, 2017). Tais eficiências de RNAi distintas parecem ser principalmente devido à degradação de dsRNA por ribonucleases de fita dupla (dsRNases) presentes no trato digestório dos insetos (Zhang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015a; Xu *et al.*, 2016; Lamontagne *et al.*, 2001; Terenius *et al.*, 2011; Garbutt *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2020).

O potencial para uso de dsRNA entregue por bactérias em silenciamento gênico em espécies de Lepidoptera já foi demonstrado (Tian *et al.*, 2009; Jing & Han, 2014; Shi *et al.*, 2016). Esta técnica foi realizada pela primeira vez em espécies de lepidópteros quando bactérias *E. coli* HT115(DE3) expressando dsRNAs correspondentes ao gene *chitin synthase A* (*SeCHSA*) de *Spodoptera exigua* foram adicionadas à dieta artificial fornecida às larvas do inseto e, assim, os dsRNAs foram introduzidos no intestino (Tian *et al.*, 2009). As larvas alimentadas com bactérias expressando dsRNA mostraram um desenvolvimento perturbado e maior mortalidade (30 – 40%) em comparação com o controle, bem como redução da expressão do gene *SeCHSA* e anormalidades morfológicas no quarto e quinto ínstares larvais e pupas. Além disso, três doses de cultura bacteriana foram testadas quanto à eficiência de RNAi em *S. exigua*. Como esperado, maior mortalidade e a maior redução na expressão de mRNA foram observadas em larvas alimentadas com a maior dose de ds*SeCHSA*, enquanto menor mortalidade e falta de *knockdown* do transcrito *SeCHSA* foram encontrados em larvas alimentadas com a menor dose de dsRNA, sugerindo que o *knock-down* suficiente do gene-alvo requer uma dose mínima de dsRNA. Além disso, a redução do transcrito de *SeCHSA* foi detectada no sétimo dia após a ingestão de dsRNA, e não no terceiro ou quinto dia, sugerindo a necessidade de acúmulo de moléculas de dsRNA para desencadear o RNAi (Tian *et al.*, 2009). De modo similar larvas de *Mythimna separata* alimentadas com células vivas de *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA contra dois genes de tubulina em dieta artificial causaram 40% de letalidade e inibição da ecdise no quinto dia tratamento (Wang *et al.*, 2018). Em *Helicoverpa armigera*, a mortalidade de lagartas aumentou em 27% quando alimentadas com bactérias *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA para silenciamento do gene *CYP6B6* do citocromo P450 (Zhang *et al.*, 2013). Outro estudo observou que a alimentação de bactérias expressando dsRNA por larvas e adultos de *Plutella xylostella* e *H. armigera*

comprometeu significativamente a ecdise larval e aumentou a mortalidade em até 50% (Israni & Rajam, 2017). O tratamento em adultos resultou em 68% de inibição da oviposição e eclosão dos ovos (Israni & Rajam, 2017). Uma outra abordagem utilizada em um estudo realizado com *S. exigua* comparou o emprego de células *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA de integrina $\beta 1$ vivas ou mortas pelo calor (Vatanparast & Kim, 2017). Neste estudo, pode-se observar que não houve diferença na taxa de mortalidade (30-35%) com o tratamento usando bactérias vivas ou mortas pelo calor. Um fator a ser considerado ainda, é que o uso de bactérias vivas como forma de pulverização em plantas pode levantar algumas preocupações de segurança.

Portanto, diante do potencial do uso de microrganismos expressando dsRNA para o controle de insetos-praga da agricultura via RNAi, buscamos validar a entrega de RNA dupla-fita para lagartas de *Diatraea saccharalis* empregando bactérias *E. coli* HT115 (DE3) transformadas para expressar dsRNA contra genes-alvo do inseto.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Clonagem de genes-alvo candidatos de *Diatraea saccharalis* no vetor de silenciamento pL4440

Três genes-alvos de *D. saccharalis* (*Chitin synthase A* - *CHI*, *Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase* - *JHEH* e *Nerverland* - *NVD*), que já se encontravam clonados em pGEM-T *Easy* (Bardella, 2015), foram subclonados no plasmídeo de silenciamento pL4440 (Addgene, Cambridge, MA, EUA; plasmid # 1654) entre duas regiões promotoras T7. Para isto, o vetor pGEM-T *Easy* (Promega Madison, WI, EUA) e o plasmídeo pL4440 foram digeridos utilizando *EcoRI* a 37°C por 16 h. Após este período, o produto da digestão foi verificado em gel de 1% agarose. As bandas de peso molecular esperadas foram recortadas do gel de agarose e purificadas com *kit QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), segundo recomendações do fabricante. Os fragmentos de cada um dos genes e o plasmídeo pL4440 foram quantificados em fluorímetro *DyNA Quant 200 fluorometer* (Hofer; Holliston, MA, EUA). Foi, então, realizada a reação de ligação dos fragmentos ao plasmídeo pL4440 utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). Após, seguiu-se a transformação por eletroporação em células competentes de *E. coli* (DH5 α), seguida de plaqueamento em meio LB (meio Luria-Bertani - 10 g L⁻¹ Triptona; 10 g L⁻¹ de NaCl; 5 g L⁻¹ Extrato de Levedura) com ampicilina (100 mg mL⁻¹), mantidas a 37°C durante 16 h. Após este período, colônias foram repicadas em meio LB líquido com ampicilina (100 mg mL⁻¹) e crescidas a 37°C durante 16 h sob agitação. Para confirmação das colônias transformadas, foi realizado reação

de PCR de cada colônia com *primers* específicos para os genes *chitin synthase A* (ATTTTCGGAAAGTTCGCTTG; TCTGCGAGATCCTCAGTTTTT; tamanho esperado do amplicon: 410 pb), *Neverland* (CGCTAAAATACCGCCTCCAT; CCCCAATGTTTCAGTTCAGG; tamanho esperado do amplicon: 441 pb) e *JHEH* (TGCACCCAAGAAAAGCTACG; CACCGCTGAATCTGTAAAGC; tamanho esperado do amplicon: 448 pb) e minipreparação plasmidial seguida de digestão com enzimas de restrição. A confirmação da clonagem foi realizada por sequenciamento para os três genes alvos e as bactérias transformadas positivas foram estocadas a -80°C.

Foram preparadas culturas eletrocompetentes das bactérias HT115 (DE3). Em seguida, 2 µL do plasmídeo pL4440:*gene-alvo* foi adicionado à 45 µL de cultura eletrocompetente e induzido por eletroporação (Gene Pulser, BioRad, Hercules, Califórnia, EUA; parâmetros - 2,5kV, 25 µF, 200Ω, cubetas de 0,2 cm). As células eletroporadas foram plaqueadas e incubadas a 37°C por 18 h em meio sólido LB adicionado de antibiótico de seleção específico da bactéria e vetor (tetraciclina 12,5 mg mL⁻¹ e ampicilina 100 mg mL⁻¹, respectivamente). Os clones foram repicados em meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos a 37°C por 18 h sob agitação. A confirmação da transformação procedeu-se através da minipreparação plasmidial seguida de digestão com enzimas de restrição. Após a confirmação, as bactérias transformadas foram estocadas a -80°C para serem utilizadas nos experimentos.

Tal cepa bacteriana, *E. coli* HT115 (DE3), por ser DE3, significa que foi geneticamente modificada para possuir em seu genoma a sequência responsável por codificar a , a T7 RNA Polimerase de um bacteriófago sob o controle do promotor T7 (Jeong *et al.*, 2009). Aliado ao fato de possuir o plasmídeo pL4440, que contém o inserto (sequência correspondente ao gene-alvo do inseto) localizado entre duas regiões promotoras T7, quando induzida com IPTG (isopropil-β-D-galactosídeo), ocorre a indução da expressão da T7 RNA Polimerase pela bactéria que induz a transcrição do fragmento nos dois sentidos e dando origem ao dsRNA correspondente ao gene-alvo do inseto. É a partir da ingestão deste dsRNA, produzido dentro da bactéria, que se desencadeia o processo de RNAi e silenciamento gênico no inseto-alvo.

3.2.2. Verificação da produção de dsRNA por bactérias *E. coli* HT115 (DE3) transformadas

Antes de iniciar os experimentos biológicos, é fundamental verificar se o processo de indução das bactérias e, conseqüentemente, produção de dsRNA estão, efetivamente, ocorrendo. Logo, colônias individuais de HT115 (DE3) contendo a construção pL4440:*CHI*

foram cultivadas em meio LB com 100 mg mL⁻¹ de ampicilina e 12,5 mg mL⁻¹ de tetraciclina a 37°C e sob agitação (120 rpm) durante 14 h. Após este período, a cultura foi diluída 100 vezes em meio 2xYT (16 g de triptona, 10 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl por litro, pH 7,0) e mantida em condições ótimas de crescimento (agitação de 130 rpm a 37°C) até atingir OD_{600nm} = 0,4 (Timmons *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). No momento em que este valor de OD_{600nm} foi atingido, uma amostra de 1,8 mL do meio de cultura contendo as bactérias foi coletada. A síntese da RNA Polimerase T7 foi induzida pela adição IPTG à concentração final de 0,4 mM e as bactérias foram mantidas por mais 4 h a 37°C sob agitação a 120 rpm. Após este tempo de indução de expressão, foi retirada mais uma amostra de 1,8 mL do meio de cultura contendo as bactérias. Tais amostras coletadas antes e após indução com IPTG foram centrifugadas a 10.000 g por 2 min e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o *pellet* foi utilizado para extração de dsRNA e confirmação da produção do mesmo.

O processo de extração de dsRNA utilizado foi o mesmo descrito por Timmons *et al.* (2001). Ao tubo de microcentrífuga contendo o *pellet* de bactéria, foi adicionado 800 µL de solução 1 M de acetato de amônio / 10 mM de EDTA e 800 µL de fenol: clorofórmio isopropanol - CIA (25:24:1 v:v:v). As amostras foram incubadas a 65°C por 30 min. Em seguida, a fase sobrenadante foi coletada e transferida para um novo microtubo. O volume equivalente à fase sobrenadante coletada foi adicionado de isopropanol e as amostras foram incubadas a -20°C *overnight*. A próxima etapa consistiu na centrifugação a 10.000 g por 30 min a 4°C. Descartou-se o isopropanol e aguardou-se a secagem do *pellet* para então fazer a suspensão do mesmo em 10 µL de tampão Tris-EDTA (pH = 7,5) (Timmons *et al.*, 2001). As amostras foram então tratadas com DNaseI (Invitrogen) com a finalidade de obter somente amostras de RNA extraídas das bactérias. O dsRNA produzido e presente nas amostras foi então observado por eletroforese em gel de 2% agarose em tampão TAE. Uma vez confirmada a produção de dsRNA pelas bactérias transformadas e induzidas, as mesmas encontram-se prontas para serem adicionadas à dieta artificial dos insetos.

3.2.3. Otimização de parâmetros de bioensaios utilizando bactérias *E. coli* HT115 (DE3)

As bactérias HT115 (DE3) transformadas com a construção pL4440:*CHI* foram escolhidas para dar início aos bioensaios de alimentação das lagartas de *D. saccharalis*. Os primeiros experimentos realizados tiveram como objetivo a otimização dos parâmetros para condução de bioensaios utilizando HT115 (DE3) como forma de entrega do dsRNA para o inseto, via dieta artificial.

Foi realizado um primeiro teste com a finalidade de avaliar qual volume de suspensão bacteriana (50 μ L, 65 μ L, 80 μ L ou 100 μ L), que ao ser fornecido aos insetos, seria responsável por causar maiores efeitos, ou ainda, evidências de silenciamento gênico.

Seguindo o mesmo processo descrito acima (item 2.1.2), as bactérias transformadas com pL4440:*CHI* foram induzidas para produção de dsRNA. Após atingirem a OD_{600nm} esperada e serem mantidas em condições ótimas de crescimento por mais 4 h em meio induzido por IPTG, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 10.000 g por 2 min em centrífuga (Sorvall) e o *pellet* de bactérias ressuspendido em água milliQ autoclavada para atingir a concentração de 250x. O volume ressuspendido foi corado com 5% de corante artificial alimentício azul (Coralim, Mix, São Bernado do Campo, Brasil) para melhor visualização do espalhamento da solução bacteriana sobre a dieta artificial. Testes prévios indicaram que o corante não afeta o desenvolvimento bacteriano (dado não mostrado). A dieta artificial foi primeiramente preparada (Tabela 1) (Paulillo, 2012) e após o cozimento, foi vertida em tubos de vidro de fundo chato autoclavados tampados com algodão hidrófilo.

Tabela 4. Composição da dieta artificial utilizada para *Diatraea saccharalis* para preparo de 1L de dieta.

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

1- Os Sais de Wesson contém os seguintes ingredientes: monofosfato de potássio (15,5 g); carbonato de cálcio (10,5 g); fosfato tri cálcico (7,45 g); cloreto de potássio (6 g); cloreto de sódio (5,25 g); sulfato de magnésio (4,5 g); sulfato de cobre (5H₂O) (0,019 g); sulfato de potássio e alumínio (0,005 g); iodeto de potássio (0,003 g); fosfato férrico (0,725 g); sulfato de manganês (0,01 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 solução vitamínica contém: 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 B12 (0,002 mg) e inositol 20 mg. Todos os componentes do complexo vitamínico podem ser adquiridos no mercado nacional e são formulados via úmida (vitamina B12) 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 o total resfriamento e solidificação da dieta artificial nos tubos de vidro, o volume de suspensão bacteriana a ser testado foi dispensado sobre a superfície da dieta artificial de cada tubo. Os tubos foram mantidos por 24 h em temperatura ambiente para que a suspensão bacteriana pudesse ser absorvida pela dieta (Figura 1A). Após esse período, uma lagarta neonata de *D. saccharalis* foi introduzida por tubo (Figura 1B). O experimento contou com 35 tubos por tratamento, sendo o controle negativo somente dieta artificial, sem adição de suspensão bacteriana. O experimento foi mantido em câmara climatizada a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, fotofase de 14 h e UR 70%.

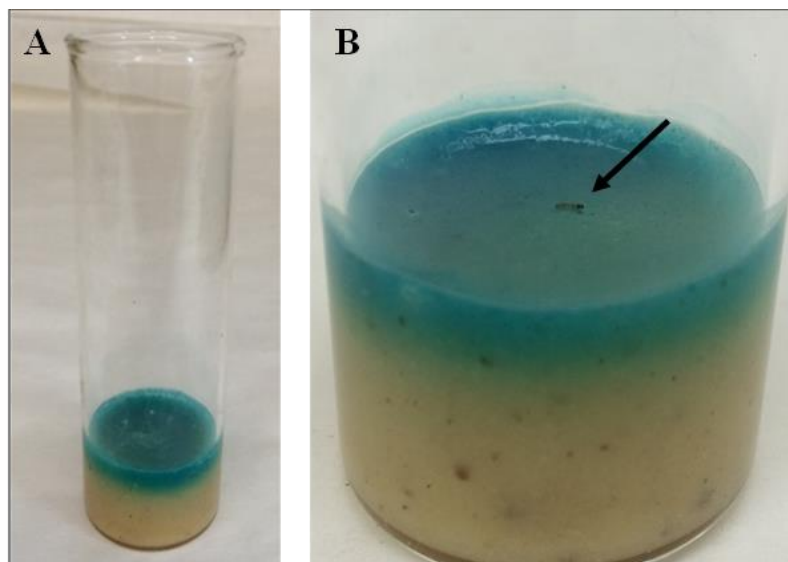


Figura 1. (A) Dieta artificial de *Diatraea saccharalis* com 100 μ L da suspensão bacteriana expressando dsRNA, corada com corante alimentício azul, disposta superficialmente na dieta; (B) Detalhe da inoculação de lagartas neonatas de *D. saccharalis* nos tubos de dieta artificial.

Os parâmetros biológicos mortalidade de larvas, duração do ciclo larval, peso de pupas e ocorrência de anormalidades morfológicas em lagartas e/ou pupas foram avaliados. Tais parâmetros representariam indícios da ocorrência de efeitos de silenciamento gênico ocorrendo nos insetos.

Em um segundo momento, buscou-se avaliar a melhor dose de dsRNA a ser utilizada nos experimentos. Para tanto, foi realizado teste comparando-se os efeitos obtidos com adição de suspensão bacteriana ressuspensa em água milliQ autoclavada para atingir a concentração de 250x e suspensão bacteriana na concentração de 500x. As bactérias transformadas foram induzidas para produção de dsRNA conforme descrito em 2.1.2. O volume ressuspensa foi corado com o corante alimentício azul e então, 100 μ L de solução bacteriana foram distribuídos na superfície da dieta artificial. Para cada tratamento (250x e 500x), foram utilizados 35 tubos, sendo o controle negativo somente dieta artificial, sem adição de suspensão bacteriana. O experimento foi mantido em câmara climatizada a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, fotofase de 14 h e UR 70%.

Por fim, com o propósito de avaliar se haveria diferenças entre a distribuição da suspensão bacteriana expressando dsRNA sobre a superfície da dieta artificial ou misturada a ela, foi desenvolvido um experimento adotando-se as doses de 250x e 500x de suspensão bacteriana. Todavia, agora, o volume bacteriano ressuspensa total (4 mL) foi adicionado ao volume total de dieta produzida (240 mL). Seguindo a indução por IPTG (item 4.2), o *pellet* bacteriano foi então ressuspensa em água milliQ autoclavada para atingir duas

concentrações de 250x e 500x. O corante alimentício azul foi adicionado à suspensão. À dieta artificial, ao atingir 50°C (antes de solidificar), foi adicionado o volume de suspensão bacteriana (4 mL). Somente após a mistura da bactéria na dieta artificial, é que a mesma foi vertida nos tubos de vidro para resfriar e solidificar (Figura 2). Após o total resfriamento, uma lagarta neonata de *D. saccharalis* foi introduzida por tubo. Foram empregados 35 tubos para dieta misturada à suspensão bacteriana na dose de dsRNA 250x e 35 tubos para dieta misturada à suspensão bacteriana na dose de dsRNA 500x. Além disso, mais 35 tubos compreenderam o controle negativo, composto somente por dieta artificial, sem adição de suspensão bacteriana. O experimento foi mantido em câmara climatizada a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, fotofase de 14 h e UR 70%.



Figura 2. Tubos de vidro contendo suspensão bacteriana expressando dsRNA, corada com corante alimentício azul, misturada à dieta artificial de *Diatraea saccharalis*.

Com relação aos modelos estatísticos adotados para análise das variáveis observados nos três experimentos descritos acima, isto é, peso de pupas (machos e fêmeas), duração do ciclo larval e mortalidade da fase larval, para as duas primeiras variáveis foram adotados modelos lineares normais (Rencher & Schaalje, 2008). Para a última, foi feita apenas uma análise de proporções. Fez-se, nos dois primeiros casos, a verificação dos pressupostos via análise de resíduos. Quando alguma pressuposição não foi atendida, procurou-se a transformação adequada para análise, mantendo assim a distribuição normal. Testes de comparações múltiplas entre os tratamentos foram realizados, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey. Utilizou-se o método de correção para múltiplos testes proposto por Benjamini & Hochberg (1995). A análise foi inteiramente realizada no software estatístico R (R Core Team, 2017) e o nível de significância adotados nos testes foi de 10% (p valor < 0,10).

3.2.4. Análise da ingestão das bactérias *E. coli* HT115 (DE3) transformadas pelas lagartas de *D. saccharalis* e acúmulo de dsRNA no intestino larval

Para confirmar se as lagartas efetivamente estavam se alimentando da dieta artificial contendo as bactérias transformadas e, conseqüentemente, que o dsRNA estaria sendo introduzido ao intestino larval por meio de ingestão, bactérias coradas com corante alimentar azul foram adicionadas à superfície da dieta artificial dos insetos e três larvas de primeiro instar foram colocadas para se alimentarem. Após a alimentação por 6 h, 12 h e 24 h, as larvas foram observadas em lupa Leica EZ4HD para determinar se as bactérias coloridas se acumularam em seu interior. Além disso, para facilitar a visualização, lagartas de quinto instar também foram colocadas para se alimentar desta dieta contendo bactérias coradas de azul e, após 6 h, foram dissecadas e tiveram seus intestinos examinados nesta mesma lupa, com o intuito de determinar se bactéria havia se acumulado dentro do intestino.

3.2.5. Bioensaio de fornecimento de bactérias *E. coli* HT115 (DE3) transformadas com pL4440: *JHEH* a lagartas de *D. saccharalis*

Um novo bioensaio de fornecimento de bactérias HT115 (DE3) expressando dsRNA a lagartas de *D. saccharalis* foi realizado utilizando outro gene-alvo de silenciamento: o *Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase* (*JHEH*). De acordo com o protocolo descrito no item 2.1.2, as bactérias transformadas com pL4440:*JHEH* foram induzidas para produção de dsRNA. Após atingirem a OD_{600nm} esperada de 0,4 e serem mantidas em condições ótimas de crescimento por mais 4 h em meio contendo IPTG, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 10.000 g por 2 min em centrífuga e o *pellet* de bactérias ressuscitado em água milliQ autoclavada para atingir a concentração de 250x. O volume ressuscitado foi corado com 5% de corante alimentar azul. A dieta artificial foi preparada (Paulillo, 2012) e após o cozimento, foi vertida em tubos de vidro de fundo chato autoclavados tampados com algodão hidrófilo. Após o total resfriamento e solidificação da dieta artificial nos tubos de vidro, 100 µL de suspensão bacteriana foi dispensado sobre a superfície da dieta artificial de cada tubo. Os tubos foram mantidos por 24 h em temperatura ambiente para que a suspensão bacteriana pudesse ser absorvida pela dieta (Figura 3A). Após esse período, uma lagarta neonata de *D. saccharalis* foi introduzida por tubo (Figura 3B). O experimento contou com 30 tubos por tratamento, sendo eles: somente dieta artificial, sem adição de suspensão bacteriana; dieta com adição de bactérias transformadas HT115 com o vetor de silenciamento vazio (pL4440) e dieta com adição de bactérias HT115 transformadas com pL4440:*JHEH*. O experimento foi mantido em câmara climatizada a 26 ± 2°C, fotofase de 14 h e UR 70%.

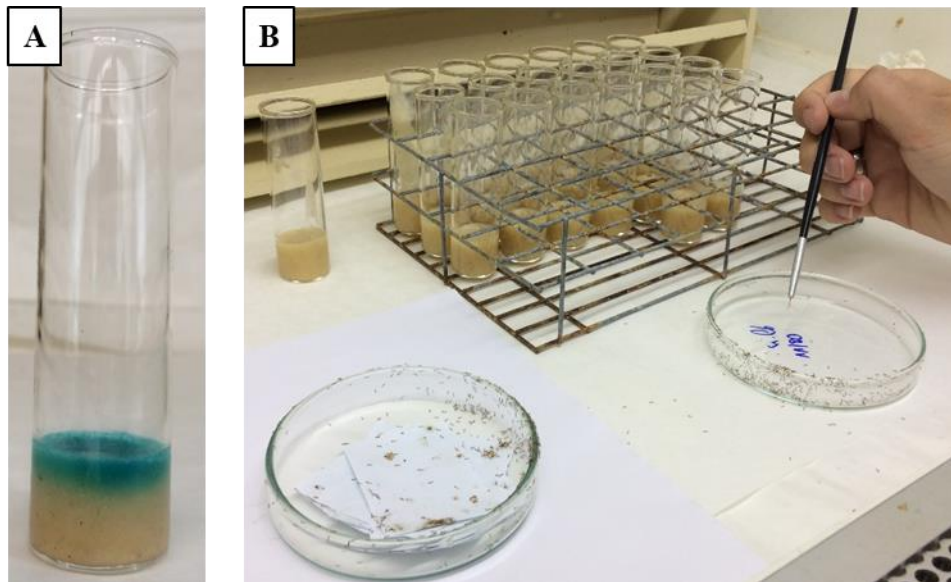


Figura 3. (A) Dieta artificial de *Diatraea saccharalis* com 100 μ L da suspensão bacteriana expressando dsRNA, corada com corante alimentício azul, disposta superficialmente na dieta; (B) Inoculação de lagartas neonatas de *D. saccharalis* nos tubos contendo dieta artificial.

A partir daí os parâmetros biológicos mortalidade da fase larval, duração do ciclo larval, peso de pupas e ocorrência de anormalidades morfológicas em lagartas e/ou pupas foram avaliados. Assim como nos ensaios anteriores, para as variáveis peso de pupas (machos e fêmeas) e duração do ciclo larval, foram adotados modelos lineares normais (Rencher & Schaalje, 2008) e para a variável mortalidade larval, foi realizada uma análise de proporções. Foi realizada a análise de resíduos de distribuição normal e em seguida, teste de comparação múltipla de médias via Tukey. Utilizou-se o método de correção para múltiplos testes proposto por Benjamini & Hochberg (1995). A análise foi inteiramente realizada no software estatístico R (R Core Team, 2017) e o nível de significância adotados nos testes foi de 10% (p valor < 0,10).

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Genes-alvos de *D. saccharalis* inseridos no vetor de silenciamento gênico pL4440

Três genes-alvos de *D. saccharalis* para o silenciamento por RNAi, o gene *Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase* (JHEH), *Neverland* (NVD) e *Chitin synthase A* (CHI), que já se encontravam clonados em pGEM-T Easy (Bardella, 2015), foram extraídos deste vetor via digestão enzimática (Figura 4) e clonados no vetor de silenciamento pL4440. A clonagem foi confirmada via PCR de colônia, digestão enzimática (Figuras 5A, B e C) e pelo sequenciamento dos fragmentos, sendo o alinhamento feito com a sequência dos próprios contigs com os clones em pGEM-T Easy (Figura 6).

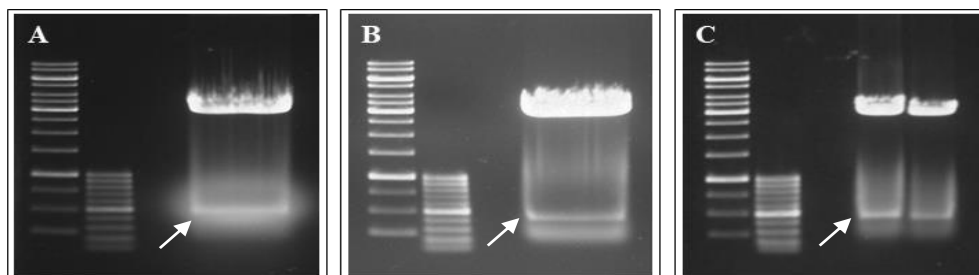


Figura 4. Digestão enzimática com *EcoRI* dos vetores pGEM-T Easy contendo fragmentos dos genes-alvo do inseto, *Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase* (A), *Neverland* (B) e *Chitin synthase A* (C), para liberação destes fragmentos (indicados pelas setas brancas). Em cada gel de agarose retratado nesta figura, as duas primeiras referem-se aos marcadores moleculares *ladders* de 1 Kb e 100 bp, respectivamente, ao passo que as demais, correspondem às amostras digeridas. Tamanho esperado dos fragmentos em A, B e C são 448, 441 e 410 pb, respectivamente).

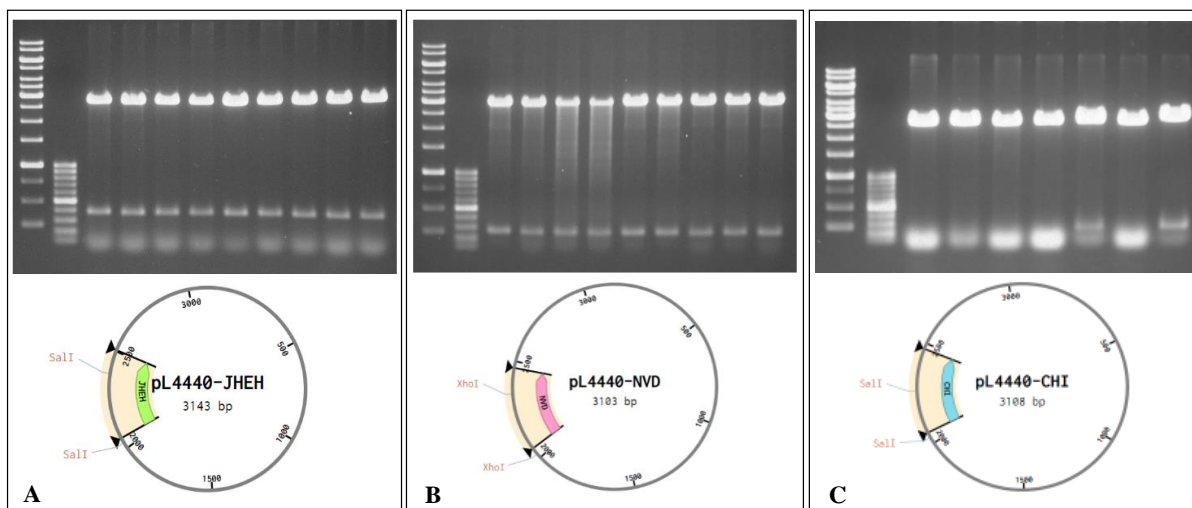


Figura 5. As duas primeiras colunas dos géis de agarose referem-se aos marcadores moleculares *ladders* de 1 kb e 100 bp (Fermentas), respectivamente, enquanto as demais correspondem às amostras de DNA plasmidial digeridas. (A) Painel superior: Digestão com *SalI*, do DNA plasmidial extraído de colônias bacterias *E. coli* HT115 (DE3) transformadas com pL4440: *JHEH*. Painel inferior: mapa dos clones no vetor pL4440. Tamanho esperado dos fragmentos: 356 pb e 2787 pb. (B) Painel superior: Digestão com *XhoI*, do DNA plasmidial extraído de colônias bacterias *E. coli* HT115 (DE3) transformadas com pL4440: *NVD*. Painel inferior: Tamanho esperado dos fragmentos: 316 pb e 2787 pb. (C) Painel superior: Digestão com *SalI*, do DNA plasmidial extraído de colônias bacterias *E. coli* HT115 (DE3) transformadas geneticamente com o vetor pL4440: *CHI*. Painel inferior Tamanho esperado dos fragmentos: 253 pb e 2875 pb.

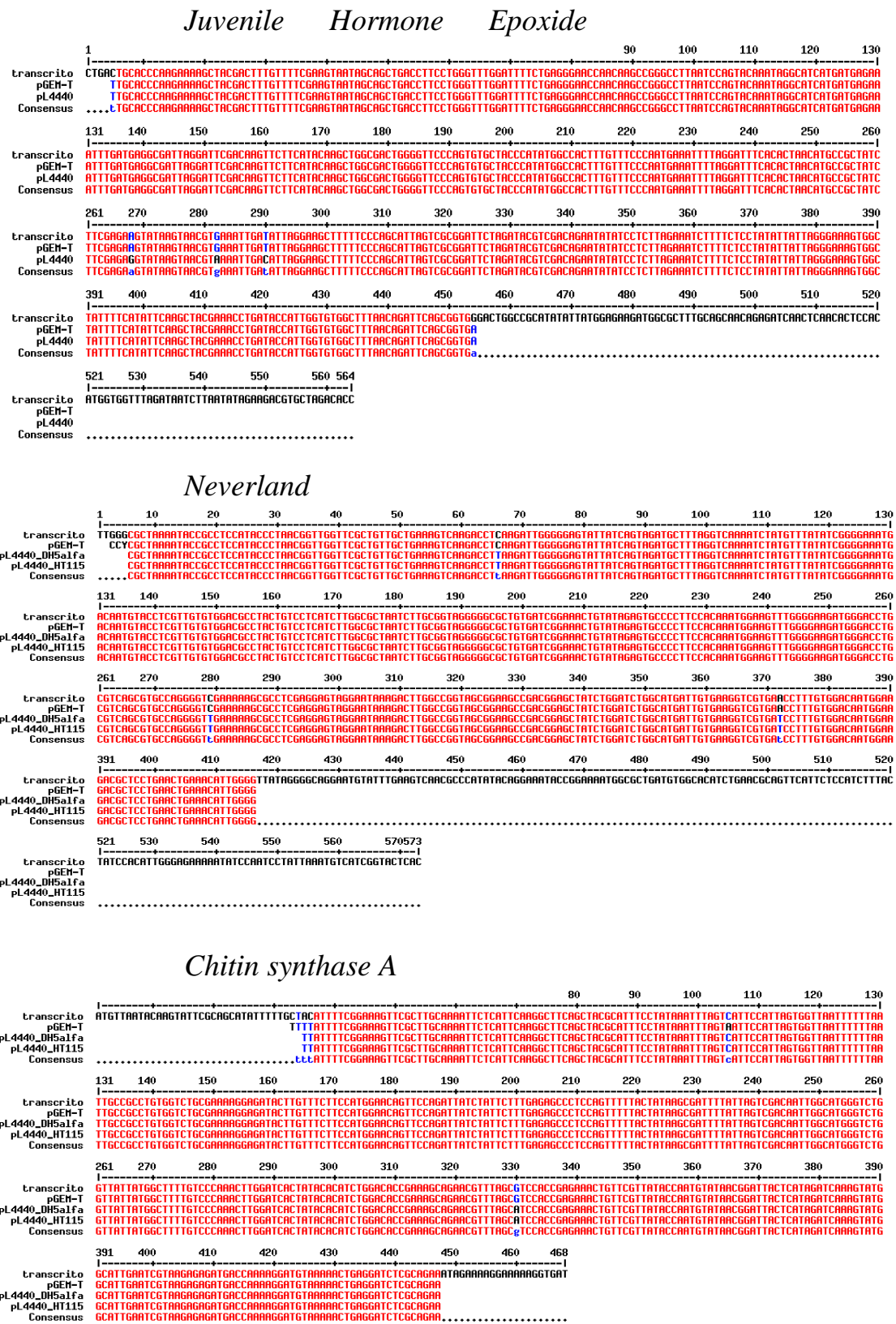


Figura 6. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do transcrito original com os fragmentos sequenciados clonados em pGEM-T *Easy* e pL4440 no genes *Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase* (JHEH), *Neverland* (NVD) e *Chitin synthase A* (CHI) de *Diatraea saccharalis*.

O gene *JHEH* faz parte da via de catabolismo do hormônio juvenil (JH). O hormônio juvenil (JH) compreende uma família de compostos sintetizados principalmente pelos *corpos allata*. JH é liberado na hemolinfa, onde possui múltiplos papéis, incluindo a regulação da metamorfose em larvas (Riddiford, 1994) e reprodução em adultos (Wyatt & Davey, 1996). Muitos estudos mostraram que os níveis de JH na hemolinfa são controlados pela alteração das taxas de sua síntese e degradação (Gilbert *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003). Pelo menos três enzimas, JH esterase (JHE) (Hammock & Sparks, 1977), JH epóxido hidrolase (JHEH) (Share & Roe, 1988) e JH diol quinase (JHDK) (Maxwell *et al.*, 2002a, Maxwell *et al.*, 2002b), estão envolvidas na via de degradação do JH (Li *et al.*, 2004). Resumidamente, JHE hidrolisa a porção éster metílico de JH para formar ácido JH, e JHEH hidrata sua porção epóxido para formar JH diol. Alternativamente, JHE degrada JH diol e JHEH degrada JH ácido para produzir JH ácido

diol para o qual nenhuma atividade foi descoberta (Share & Roe, 1988) (Figura 7).

A maior parte da pesquisa sobre a degradação do JH concentrou-se no mecanismo de ação do JHE (Kamita *et al.*, 2003). Embora pouco se saiba sobre JHEH, parece que JHEH é tão crítico quanto JHE no desenvolvimento de insetos (Keiser *et al.*, 2002; Kamita *et al.*, 2003).

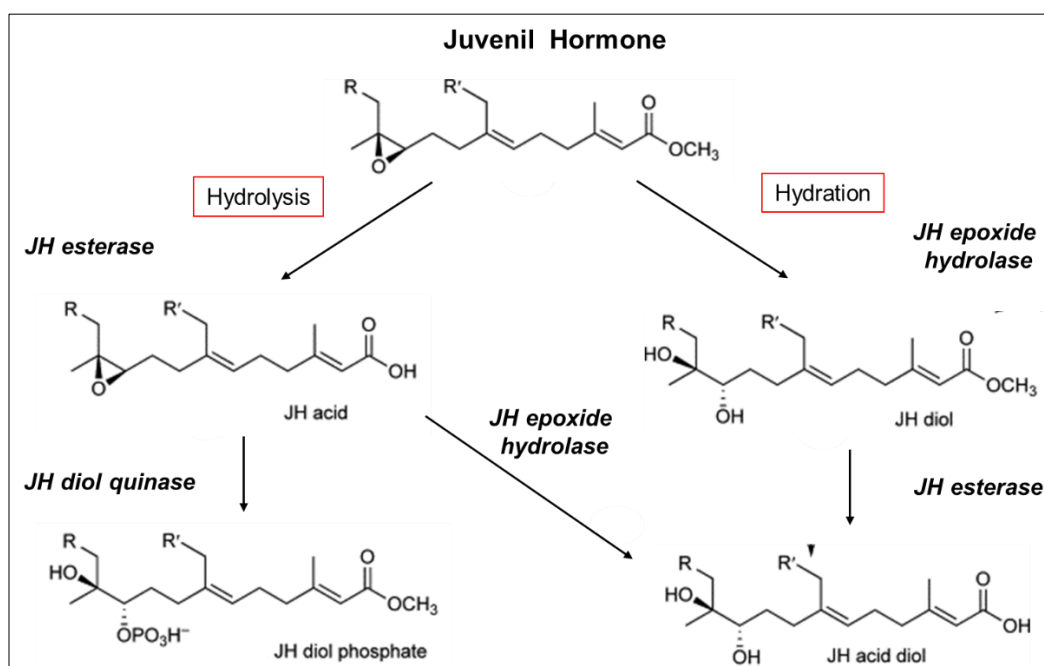


Figura 7. Via de degradação do Hormônio Juvenil (JH) nos insetos. Adaptado de Chapman 2013.

Como JH é um hormônio específico em insetos, que desempenha papéis importantes na regulação de processos fisiológicos no desenvolvimento e maturação reprodutiva (Seino *et*

al., 2010), interferir em sua biossíntese ou processo de degradação é considerada uma estratégia promissora para inseticidas alternativos, como RNAi. A microinjeção de dsRNA contra o gene *JHEH* em ninfas de *Apolygus lucorum* no início do 3º instar, resultou nos dias 2, 3, 4 e 5 após a exposição aos dsRNA-*AIJHEH*, em uma redução significativa nos níveis de expressão de mRNA relativos do gene *AIJHEH* em comparação com aqueles no controle sem injeção e grupos de injeção de dsRNA-GFP (Tusun *et al.*, 2017). Além disso, houve uma redução significativa na taxa de sobrevivência dos indivíduos do grupo sob injeção de dsRNA-*AIJHEH*, a partir de 2 dias após a injeção em comparação com os grupos de controle e injeção de dsRNA-GFP. Ainda, algumas ninfas que foram injetadas com dsRNA-*AIJHEH* apresentaram dificuldade na ecdise e acabaram morrendo (Tusun *et al.*, 2017).

No lepidóptero *Tuta absoluta*, larvas alimentadas com bactérias expressando dsRNA visando *JHEH* não apresentaram aumento significativo na mortalidade (Bento *et al.*, 2020). Entretanto, os tratamentos com dsRNA reduziram os níveis de transcrição e encurtaram a duração do ciclo larval. A redução significativa no acúmulo de transcritos de *JHEH* em larvas alimentadas com dsRNA de *JHEH* em comparação com o controle negativo foi observada apenas aos 3 dias de alimentação, com uma diminuição para 78,9% do acúmulo relativo de transcritos (Bento *et al.*, 2020).

Em *Leptinotarsa decemlineata*, a ingestão por 3 dias de três distintos dsRNAs desenhados contra o gene *JHEH* pelas larvas de 4º instar diminuiu a abundância de mRNA *LdJHEH1* em 94,5%, 90,7% e 14,0% e de *LdJHEH2* em 13,5%, 9,0% e 58,5%, respectivamente, em comparação com o controle (Lü *et al.*, 2015). A ingestão contínua de dsJHEH1 e dsJHEH2 reduziu ligeiramente o peso larval, retardou o desenvolvimento larval e prejudicou significativamente a emergência dos adultos (Lü *et al.*, 2015).

Para *Plutella xylostella*, foi demonstrado que a entrega oral de dsRNA específico para gene *JHEH* em cinco concentrações, 1, 2, 5, 10 e 20 µg/µL e em quatro pontos de tempo, a saber, 24, 48, 72 e 96 h, interferiu significativamente na abundância de transcritos de *JHEH* (Chaitanya *et al.*, 2017). O nível de transcritos de *JHEH* foi significativamente reduzido com o aumento da concentração de dsRNA conforme análise de RT-qPCR. Além disso, com o *uptake* contínuo de dsPxJHEH, foi observada mortalidade significativa devido ao silenciamento do gene alvo (Chaitanya *et al.*, 2017). A taxa de mortalidade foi registrada nos quatro momentos em comparação com cinco concentrações de dsRNA (1, 2, 5, 10 e 20 µg/µL). A mortalidade aumentou com o aumento da concentração de dsRNA. O tratamento com dsPxJHEH a 20 µg/µL em 96 h resultou em 66,66% de mortalidade, por exemplo (Chaitanya *et al.*, 2017)

Por fim, nos insetos, o exoesqueleto rígido (cutícula) os protege da dessecação e de seus inimigos naturais. No entanto, também restringe seu crescimento e metamorfose (Balabanidou *et al.*, 2018). Por esse motivo, periodicamente, durante o ciclo de vida de um inseto, a cutícula velha deve ser parcialmente digerida, e uma cutícula nova e expansível secretada, e o resíduo indigerível da cutícula velha se desprende (Noh *et al.*, 2016). Esse processo é conhecido como muda ou ecdise. O processo de muda do inseto é controlado pelo hormônio da muda 20-hidroxiecdisona (20E) (Niwa & Niwa, 2016). A biossíntese de 20E é mediada por uma série de enzimas altamente conservadas conhecidas como genes *Halloween*, dentro os quais inclui-se o gene *Neverland* (Rewitz *et al.*, 2007; Festucci-Buselli *et al.*, 2008).

O gene precursor de 20E, ecdisona (E), é sintetizado principalmente a partir do colesterol oriundo da dieta nas glândulas protorácicas (Schumann *et al.*, 2018). Neste processo, a primeira etapa consiste na conversão do colesterol em 7-desidrocolesterol. Essa reação é catalisada pela proteína do domínio Rieske, *Neverland* (Yoshiyama *et al.*, 2006; Sumiya *et al.*, 2016), expresso na glândula protorácica. Em seguida, o 7-desidrocolesterol é convertido em 5-cetodiol (2,22,25-trideoxiecdisona). O processo é conhecido como *black box* e é catalisado por um grupo de reações desconhecidas (Ono *et al.*, 2006). Subsequentemente, o cetodiol é ainda convertido em cetotriol, 2-desoxiecdisona e ecdisona em reações catalisadas pelas citocromo peroxidases CYP306A1 (Wan *et al.*, 2014a), CYP302A1 (Wan *et al.*, 2014b) e CYP315A1 (Wan *et al.*, 2015), respectivamente. Finalmente, o precursor 20E ecdisona é transferido para a cavidade corporal por um mecanismo de tráfego vesicular e é posteriormente transformado em sua forma mais ativa, 20E, pelo CYP314A1 em vários tecidos periféricos, incluindo os túbulos de Malpighi, corpos gordurosos e intestino médio (Petryk *et al.*, 2003). Além da via clássica de síntese de tecido periférico das glândulas protorácica, representada na Figura 8 (Schumann *et al.*, 2018), o 20E também pode ser sintetizado nos ovários de fêmeas adultas e pela via amnioserosa-epiderme durante o estágio embrionário (Rewitz *et al.*, 2007).

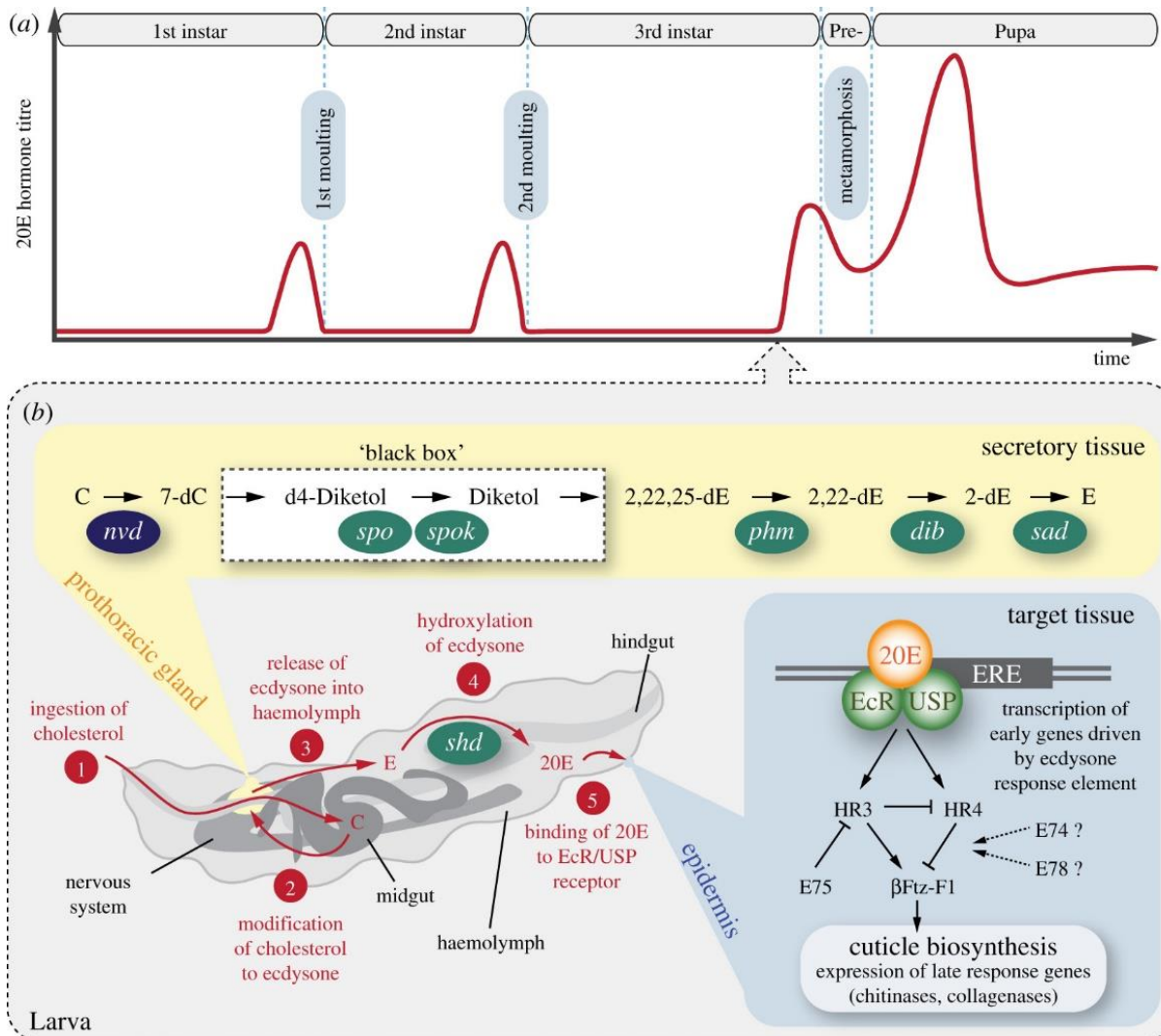


Figura 8. Concentração hormonal e via de muda precoce em *Drosophila melanogaster*. (a) Alterações na concentração de 20-hidroxiectidisona durante o desenvolvimento. Observe que a concentração aumenta pouco antes de cada muda e metamorfose. (b) Biossíntese de ecdisteróides e via de muda precoce em uma larva de 3º instar (ponto de tempo indicado pela seta em (a)). Os números de 1 a 5 indicam as principais etapas da biossíntese e da ligação ao receptor de ecdisteróide. A ingestão de colesterol dietético é seguida pela biossíntese de ecdisona no tecido secretor (glândula protorácica), que é controlada por enzimas codificadas pelo gene do domínio Rieske *Neverland* (*nvd*), e pelos genes *Halloween spook* (*spo*), *spookier* (*spok*), *phantom* (*phm*), *disembodied* (*dib*) e *shadow* (*sad*). A ecdisona é então liberada na hemolinfa e oxidada a 20-hidroxiectidisona por uma oxidase codificada por *shade* (*shd*). A ligação da 20-hidroxiectidisona ao complexo receptor EcR/USP no tecido alvo (epiderme) ativa a transcrição dos genes Early (E74, E75, E78, HR3, HR4 e β Ftz-F1), que é seguida pela biossíntese da cutícula. 2-dE, 2-desoxiectidisona; 2,22-dE, cetotriol; 2,22,25-dE, cetodiol; 7-dC, 7-desidrocolesterol; 20E, 20-hidroxiectidisona; C, colesterol; E, ecdisona; E74, gene 74 indutível por ecdisona; E75, gene 75 indutível por ecdisona; E78, gene 78 indutível por ecdisona; HR3, receptor hormonal 3; HR4, receptor hormonal 4; β Ftz-F1, fator de transcrição beta Fushi-tarazu 1; EcR, receptor de ecdisona; ERE, elemento de resposta à ecdisona; USP, Ultraespiráculo. Figura retirada de Schumann *et al.*, 2018.

Sendo assim, os genes *Halloween*, dos quais faz parte o *Neverland*, envolvem a biossíntese de um hormônio de muda que não apenas desempenha um papel fundamental na ecdise de insetos, mas também é vital para o desenvolvimento, metamorfose e reprodução (Schumann *et al.*, 2018). Logo, estes genes constituem um grande potencial como alternativa para silenciamento gênico e controle de insetos-praga via RNAi.

Quitinas sintases, por sua vez, codificadas pelos genes incluindo *chitin synthase A*, são proteínas de membranas que catalisam a síntese de quitina. Em insetos, a quitina é um constituinte estrutural de matrizes extracelulares, incluindo a cutícula da epiderme, os revestimentos das traqueias, glândula salivar, intestino anterior e posterior, e a matriz peritrófica (MP) do intestino médio (Araújo *et al.*, 2005; Moussian, 2013). Forma uma barreira física que protege os insetos de toxinas e patógenos (Patel e Goyal, 2017; Pesch *et al.*, 2016), e desempenha um papel importante na sobrevivência, crescimento e metamorfose dos insetos (Chen *et al.*, 2008; Firmino *et al.*, 2013; Palaka *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2016a; Shi *et al.*, 2016b). Portanto, a interrupção do metabolismo da quitina durante a ecdise de insetos é uma estratégia alternativa promissora para desenvolver métodos baseados em interferência de RNA para controle de pragas (Lu *et al.*, 2019).

O processo de biossíntese de quitina requer várias enzimas, entre elas, a quitina sintase (Merzendorfer, 2011; Moussian, 2013). Trata-se de uma enzima conservada encontrada em todos os organismos sintetizadores de quitina (Lu *et al.*, 2019). Pertence às hexosiltransferases da grande família das glicosiltransferases, que catalisam a transferência de porções de açúcar de doadores de açúcar ativado para aceptores específicos, formando assim uma ligação glicosídica (Liu *et al.*, 2019). Na maioria dos insetos, as quitinas sintases foram segregadas em dois grupos, a saber, *chitin synthase A* (ou *chitin synthase 1*) e *chitin synthase B* (ou *chitin synthase 2*), com base na composição do domínio, similaridade de sequência, localização do tecido e papel fisiológico (Arakane *et al.*, 2005; Arakane *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2007; Hogenkamp *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2006; Merzendorfer, 2011; Zimoch *et al.*, 2005). A *chitin synthase A* é distribuída exclusivamente nas células epidérmicas derivadas do ectoderme, incluindo epiderme, traqueia, glândula salivar, células do intestino anterior e posterior, e é responsável pela síntese de quitina nesses tecidos.

Em *Tribolium castaneum*, o *knockdown* de *chitin synthase A* interrompe a ecdise entre os estágios larva-larva, larva-pupa e pupa-adulto devido à redução da síntese cuticular de quitina (Agrawal *et al.*, 2014; Arakane *et al.*, 2005; Arakane *et al.*, 2008; Kelkenberg *et al.*, 2015). Em *Drosophila melanogaster*, embriões com mutações homozigóticas de *chitin synthase A* são incapazes de quebrar a casca do ovo (Ostrowski *et al.*, 2002). Em *Henosepilachna vigintioctopunctata*, o *knockdown* deste gene afetou a biossíntese de quitina, a integridade da matriz peritrófica do intestino médio e das traqueias, e a muda larva-larva e larva-pupa (Jiang *et al.*, 2021).

Em lepidópteros, as espécies *Spodoptera litura*, *Chilo partellus*, *Plutella xylostella* e *Maruca vitrata*, foram expostas aos dsRNA correspondente ao gene *chitin synthase A*, através

de uma entrega exógena de dsRNA e RNAi mediado por plantas (Rana *et al.*, 2020). A introdução de dsCHSA causou fenótipos letais do tipo “meia ecdise” e uma redução significativa no peso corporal das larvas. A análise de RT-qPCR demonstrou a regulação negativa dos transcritos do gene *CHSA* de 1,38 a 8,33 vezes nas quatro espécies-alvo (Rana *et al.*, 2020). Além disso, quando as larvas de *S. litura* se alimentaram com folhas de plantas de tabaco transgênicas expressando dsSICHTSA, a abundância de mRNA do gene *CHSA* foi significativamente diminuída, resultando em fenótipos letais como “formação de cabeça dupla” e “meia ecdise”. Anormalidades no estágio pupa-adulto e adulto também foram observadas, sugerindo fortemente o efeito RNAi do gene *CHSA* em estágios tardios de desenvolvimento (Rana *et al.*, 2020).

No caso de *Leucinodes orbonalis*, outra espécie de lepidóptero, indivíduos alimentados com dieta suplementada com bactéria expressando dsRNA contra o gene *chitin synthase* exibiram um período larval de 15-19 dias, um pouco mais longo do que o observado no controle (13-17 dias) (Saxena *et al.*, 2022). Alguns dos indivíduos nas condições de dieta alimentadas com pL4440-CHS demonstraram um período larval acima 20 dias. Além disso, para as larvas que se alimentam de dsCHS, a pupariação foi retardada, após 16 a 18 dias de alimentação, enquanto o controle foi após 14 a 16 dias de alimentação (Saxena *et al.*, 2022). A alimentação contínua causou uma redução estatisticamente não significativa de 7 a 10% no peso médio das larvas alimentadas com dsCHS em comparação com as larvas alimentadas com a dieta controle. A mortalidade larval de cerca de 45% nas larvas alimentadas com dsCHS, contra 7% das larvas do tratamento controle (Saxena *et al.*, 2022). Portanto, pode-se afirmar que a manipulação da via metabólica da quitina pode ser explorada como um método potencial para controlar pragas de insetos (Wu *et al.*, 2019a; Wu *et al.*, 2019b).

Com relação a estes genes identificados no transcriptoma de *D. saccharalis*, provenientes de *contigs* encontrados no transcriptoma do inseto não representavam o transcrito completo. Em *Bombyx mori*, o gene *JHEH* possui 2.796 pb e sua proteína correspondente é constituída por 460 aminoácidos. Para o *NVD* são 1.679 pb, codificando uma proteína de 453 aminoácidos. Já *CHI* possui 4.869 pb e codifica 1.563 aminoácidos. Com relação à sequência dos *contigs* dos genes identificados e clonados para *D. saccharalis*, *JHEH*, *NVD* e *CHI*, possuem 564 pb, 573 pb e 468 pb. No entanto, as sequências clonadas em pGEM-T *Easy* por Bardella (2015) correspondem a 450 pb, 414 pb e 415 pb para os genes *JHEH*, *NVD* e *CHI*, respectivamente. Por fim, encontram-se clonados em pL4440 os

fragmentos gênicos dos seguintes tamanhos: JHEH com 450 pb, NVD com 411 pb e CHI com 413 pb (Tabela 2).

Tabela 5. Tamanho em pares de base (pb) da sequência montada dos transcritos de *Diatraea saccharalis*, bem como de seus respectivos fragmentos gênicos clonados nos vetores pGEM-T *Easy* (Bardella, 2015) e pL4440 (este trabalho).

Gene	Tamanho do transcrito (pb)	Tamanho do fragmento clonado em pGEM-T <i>Easy</i> (pb)	Tamanho do fragmento clonado em pL4440 (pb)
<i>Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase (JHEH)</i>	564	450	450
<i>Nerverland (NVD)</i>	573	414	411
<i>Quitina sintase (QS)</i>	468	415	413

Apesar de não corresponder à sequência gênica completa, o tamanho destes fragmentos é considerado suficiente para desencadear uma resposta de RNAi, uma vez que o dsRNA longo será processado pela enzima Dicer em inúmeros pequenos siRNAs, com aproximadamente 20 a 25 pb, os quais serão propriamente utilizados pela maquinaria de silenciamento como guias para localizar o transcrito alvo do inseto.

3.3.2. Confirmação da produção de RNA dupla-fita (dsRNA) por *E. coli* HT115 (DE3)

Para dar início aos experimentos de alimentação de lagartas de *D. saccharalis* em dieta artificial contendo bactérias HT115 (DE3) expressando dsRNA, era necessário, primeiramente a comprovação da indução das bactérias HT115 (DE3) transformadas com os genes do inseto e a real expressão de dsRNA. Assim, utilizando processo de extração de dsRNA (Timmons *et al.*, 2001) foi possível comprovar que HT115 (DE3) transformadas com a construção pL4440: *CHI* expressam dsRNA após indução por IPTG, conforme apresentado no gel de 2% agarose (Figura 9). HT115(DE3) transformada com somente com o vetor pL4440 sem inserto foi utilizada como controle negativo do produto de extração de dsRNA.

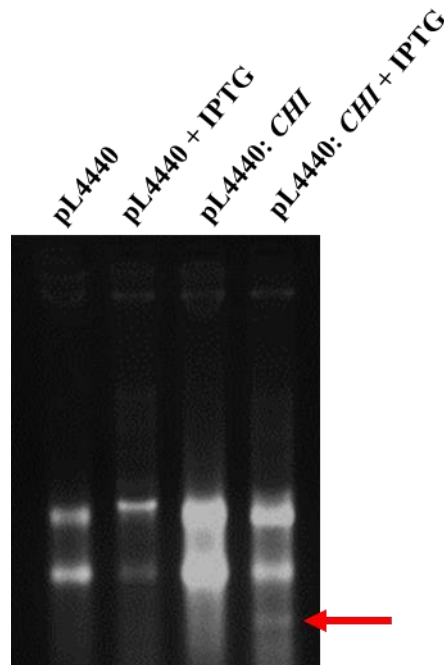


Figura 9. Gel eletroforese para confirmação da produção de dsRNA em células de *Escherichia coli* HT115 (DE3). Amostras das culturas de células bacterianas foram coletadas antes e após adição de IPTG ao meio. As canaletas correspondem à bactéria HT115 (DE3) transformada com o plasmídeo pL4440 sem indução com IPTG; HT115 (DE3) transformada com o plasmídeo pL4440 induzida com IPTG; HT115 (DE3) transformada com pL4440: *CHI* sem indução e; HT115 (DE3) transformada com pL4440: *CHI* induzida. A seta vermelha indica a posição da banda de dsRNA.

3.3.3. Bioensaios para otimização de parâmetros

Foram realizados alguns experimentos com o objetivo de otimizar os parâmetros para condução de bioensaios utilizando bactérias *E. coli* HT115 (DE3) transformadas como forma de entrega de dsRNA para *D. saccharalis*, via dieta artificial. Para tanto, determinou-se a utilização de bactérias HT115 (DE3) transformadas com a construção pL4440: *CHI* para dar início aos bioensaios de alimentação das lagartas de *D. saccharalis*. Vale ressaltar novamente que, neste primeiro momento, buscava-se avaliar o efeito da alimentação de lagartas com dieta artificial contendo bactérias expressando dsRNA sobre o desenvolvimento das lagartas. Isto é, procuravam-se indícios fenotípicos da ocorrência de silenciamento gênico nestes insetos, para posteriormente, confirmar-se o silenciamento por meio de análises de expressão do gene alvo via RT-qPCR. Assim, foram avaliados os parâmetros mortalidade da fase larval (%); duração da fase larval (dias) e peso de pupas (mg).

O primeiro teste consistiu na determinação do melhor volume de suspensão bacteriana a ser adicionado à dieta artificial dos insetos. Na avaliação da fase larval de *D. saccharalis*, nos tratamentos com adição de 50 μ L, 65 μ L, 80 μ L e 100 μ L de suspensão de bactérias expressando dsRNA correspondente ao alvo *chitin synthase A* (HT115:dsRNA *CHI*) verificou-se uma mortalidade de 11,43%, 5,71%, 14,29% e 5,71%, respectivamente, não

diferindo substancialmente do controle (Dieta), cuja taxa de mortalidade foi de 2,86% (Figura 10). O ensaio teve duração total de 40 dias.

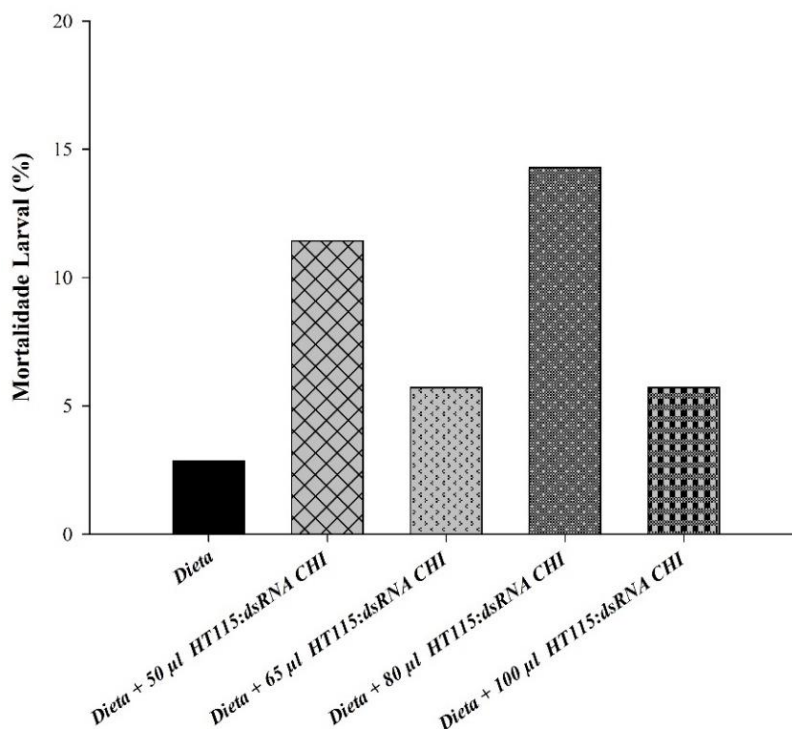


Figura 10. Porcentagem de mortalidade da fase larval de *Diatraea saccharalis* após as lagartas neonatas se alimentarem de dieta artificial contendo diferentes volumes de suspensão de bactéria *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA correspondente ao gene *chitin synthase A* (*CHI*). A duração da fase larval foi de 38 dias.

As lagartas que sobreviveram aos tratamentos e se transformaram em pupas foram sexadas, sendo avaliado o peso de pupas e a duração da fase larval para machos e fêmeas, separadamente. Quanto ao peso de pupas e duração larval de machos e fêmeas, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos de diferentes volumes de adição de bactéria (HT115: dsRNA *CHI*) e o controle somente com dieta artificial (Figuras 11 e 12).

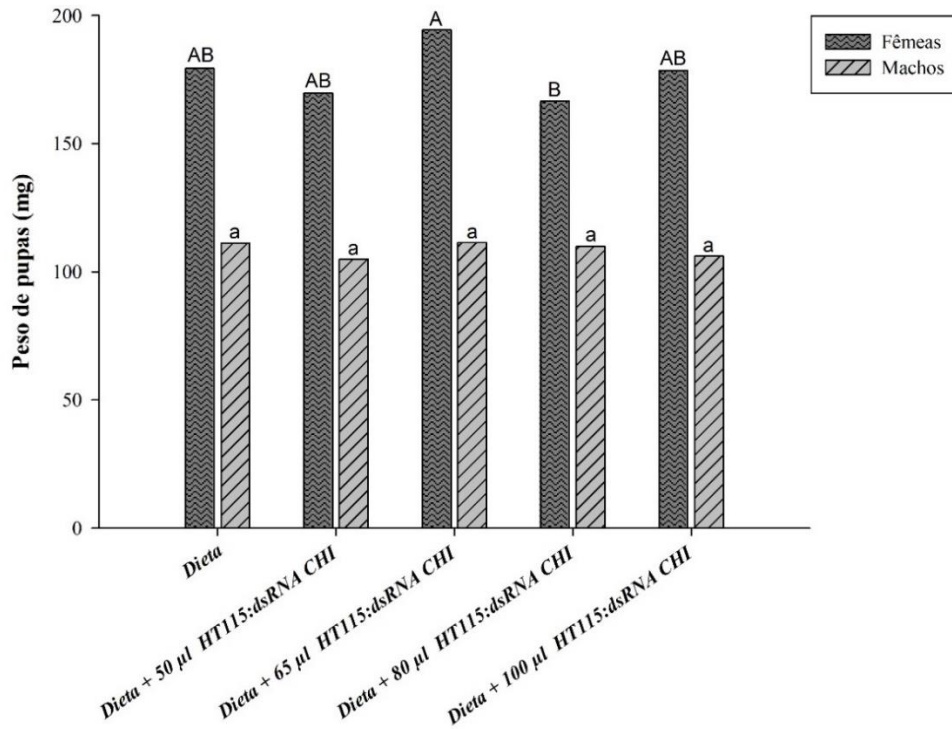


Figura 11. Peso (mg) de pupas fêmeas e machos de *Diatraea saccharalis* após as lagartas se alimentarem de dieta artificial contendo volumes crescentes de suspensão bacteriana de *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA correspondente ao gene *chitin synthase A* (*CHI*). Barras seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,1$). Macho: $p = 0,5736$; Fêmea: $p = 0,0898$.

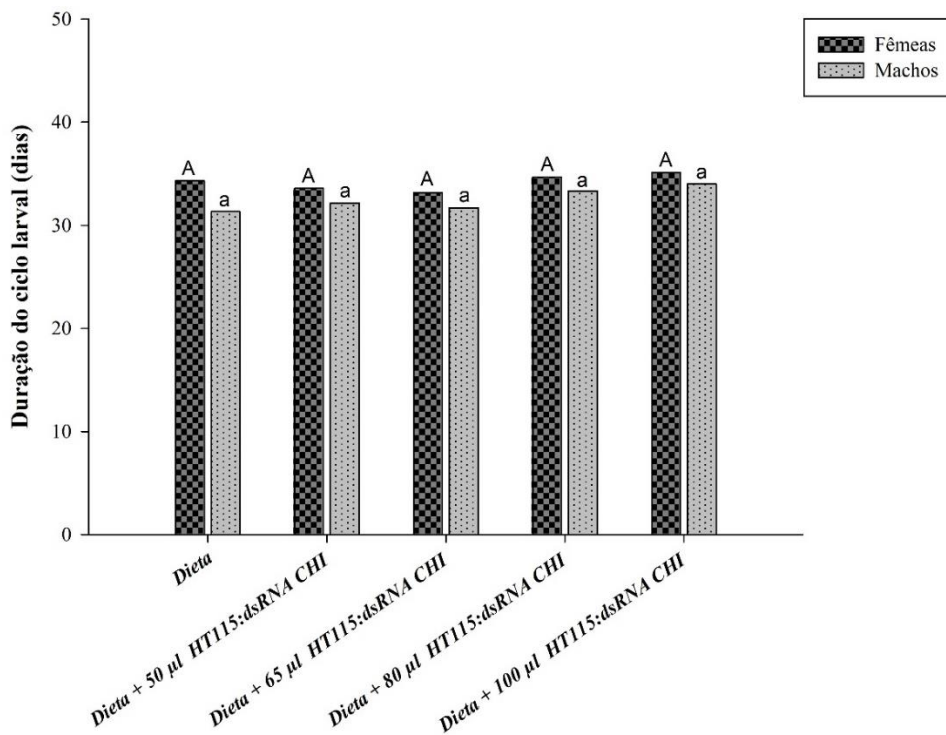


Figura 12. Duração (dias) do ciclo larval de fêmeas e machos de *Diatraea saccharalis* após as lagartas se alimentarem de dieta artificial contendo diferentes volumes de suspensão bacteriana de *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA correspondente ao gene *chitin synthase A* (*CHI*). Barras seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,1$). Macho: $p = 0,0998$; Fêmea: $p = 0,5300$.

Para lepidópteros têm sido utilizados diversos volumes de suspensão bacteriana fornecida aos insetos-alvo via alimentação, para os quais os resultados obtidos de silenciamento gênico têm sido satisfatórios. Wang *et al.* (2018) empregaram 200 μ L de suspensão bacteriana expressando dsMs α -tubulin e dsMs β -tubulin adicionadas à dieta artificial, para alimentação de *Mythimna separata*, e obtiveram 40% das larvas expostas ao tratamento que não conseguiram completar a muda e morreram. Em *Helicoverpa armigera*, a ingestão contínua de dieta artificial contendo 100 μ L de bactéria contendo dsRNA contra o gene proteína ultraespiráculo (USP) ocasionou um aumento na taxa de mortalidade larval de 34,1% e uma diminuição na taxa de sucesso pupariação em 68,7%, em comparação com o controle tratado com bactérias expressando dsEGFP (Yang & Han, 2014). O nível de transcrição do gene alvo nas larvas tratadas também diminuiu 40,3% em comparação com o controle e foi possível observar insetos deformados tanto nos estágios de larva como de pupa (Yang & Han, 2014).

Vatanparast *et al.* (2021), visando realizar o silenciamento e controle de *H. armigera*, realizaram bioensaios nos quais pedaços de dieta artificial (1 cm \times 1 cm \times 2 mm) foram cobertos com 100 μ L de suspensão de células bacterianas HT115 expressando dsRNA contra dois genes tripsina (*Ha-TRY39* e *Ha-TRY96*), quimotripsina (*Ha-CHY*) e catepsina-L (*Ha-CAT*). Quando o dsRNA para cada gene foi ingerido pelas larvas, todos os quatro genes mostraram reduções significativas. O maior efeito de RNAi foi observado em 72 h após alimentação em todas as quatro proteases, exibindo uma redução de 30% a 70% nos níveis de expressão de mRNA. Dentre esses candidatos, a quimotripsina apresentou maior redução sob RNAi. Os resultados mostraram que após 96 h de incubação em ambos os métodos de entrega, *Ha-CHY* diminuiu cerca de 80% na alimentação (Vatanparast *et al.* 2021).

O volume de 100 μ L de suspensão bacteriana expressando dsRNA também foi utilizado para alimentação, via dieta natural (folhas), de *H. armigera* e *P. xylostella* por Israni & Rajam (2017). A alimentação de dsRNA referente ao gene *EcR* levou à regulação negativa do transcrito alvo nos insetos. Houve uma redução de 2,8 vezes na expressão do gene em larvas de *P. xylostella* alimentadas com dsEcR, enquanto a alimentação de dsEcR em larvas de *H. armigera* levou à uma queda de aproximadamente 2,7 vezes nos transcritos quando comparada com a controle. Para *P. xylostella*, a mortalidade larval se iniciou a partir do quarto instar larval nos insetos alimentados com dsEcR. O crescimento larval foi atrofiado em comparação com os insetos controle. As larvas alimentadas com dsEcR eram significativamente menores em tamanho em comparação com as larvas de controle não tratadas (Israni & Rajam, 2017). A alimentação de dsEcR pelas larvas de *H. armigera* levou a

um atraso geral no desenvolvimento. Também se notou a formação de intermediários larva-pupa anormais e anormalidades nas pupas, como persistência de muda larval. No final da pupariação, 20% de mortalidade pupal foi registrada para insetos alimentados com dsEcR e no final do período pupal, a mortalidade média foi de 22,5% (Israni & Rajam, 2017).

Também foi demonstrada a eficiência da adição de 65 µL de suspensão de *E. coli* HT115 expressando dsRNA para o silenciamento gênico de *Tuta absoluta* via RNAi (Bento *et al.*, 2017). O fornecimento de 65 µL de bactérias expressando dsRNA, junto à dieta artificial do inseto contra o gene *juvenile hormone inducible protein (JHP)* levou a um aumento significativo na mortalidade larval (45,6%) em relação aos controles negativos, que exibiram mortalidade variando de 21,1% a 28,9%. A diminuição no acúmulo de transcrito alvo foi significativa, variando de 52,5% aos 3 dias de alimentação para 57,2% aos 9 dias de alimentação em relação ao controle. O mesmo pode ser observado para o gene-alvo *chitin synthase A (CHI)*. Os 65 µL de bactérias expressando dsCHI fornecidos às lagartas aumentou significativamente a taxa de mortalidade de larvas de *T. absoluta* (até 45,6%) em relação ao controle (Bento *et al.*, 2017). A diminuição significativa na transcrição de *CHI*, observada no terceiro dia após alimentação, 27,9% menor que a expressão gênica no tratamento controle. Para o gene *carboxylesterase (COE)*, larvas alimentadas com dieta suplementada com 65 µL bactérias expressando dsCOE apresentaram um aumento significativo na mortalidade (48,9%) em relação aos controles negativos sem adição de bactérias (24,4%), bactérias sem dsRNA expressão (26,7%) ou dsRNA GFP (28,9%) (Bento *et al.*, 2017). A avaliação da expressão de *COE* mostrou que o tratamento com dsCOE levou à uma diminuição significativa de 22,2% e 47,9% no acúmulo de transcritos em vários momentos de alimentação, particularmente 3 e 9 dias após alimentação, respectivamente, em comparação com o controle. A redução significativa de transcritos de *COE* pareceu estar associada à mortalidade significativa das larvas, de 48,9%. Finalmente, o fornecimento de 65 µL de bactérias expressando dsAK (dsRNA contra o gene *arginine kinase - AK*), levou a um aumento significativo na mortalidade das larvas, atingindo 72,2% de taxa de mortalidade larval. O acúmulo de transcritos de *AK* foi significativamente reduzido em 3 e 6 dias de alimentação, com uma diminuição de 34,6% e 39,1%, respectivamente (Bento *et al.*, 2017).

Já o volume de 50 µL de suspensão bacteriana expressando dsRNA foi utilizado para encobrir pellets de dieta artificial para alimentação de lepidópteros *Spodoptera exigua* (Tian *et al.*, 2009). Usando o gene *chitin synthase A (SeCHSA)* como alvo, mostrou-se que o crescimento e desenvolvimento de larvas de *S. exigua* alimentadas com *E. coli* HT115 expressando dsSeCHSA foi prejudicado, resultando em letalidade. No 4º e 5º instares larvais,

pré-pupas e pupas, as taxas médias de sobrevivência dos insetos alimentados com a dieta contendo dsRNA foram 88,6%, 74,2%, 68,4% e 62,6%, respectivamente (Tian *et al.*, 2009). As taxas de sobrevivência nas larvas de 5º instar, pré-pupas e fases de pupa foram significativamente menores do que as de todos os controles, e diferenças significativas de letalidade também foram encontradas entre o tratamento dsSeCHSA e controle nas larvas de 4º instar (Tian *et al.*, 2009).

Também foram realizados bioensaios com fornecimento de apenas 20 µL de suspensão bacteriana expressando dsRNA adicionada à dieta artificial fornecida ao inseto. Esse foi o caso do estudo do gene *neuropeptídeo natalisina (NTL)* em *Spodoptera litura* (Wang *et al.*, 2021). Para explorar a função de SINTL e avaliar seu potencial como alvo para controle de pragas, foi realizado o knockdown de SINTL em ambos os sexos do inseto usando RNAi mediado por bactérias (Wang *et al.*, 2021). Resumidamente, as larvas de 3º instar (9 d) foram dispostas individualmente em células plásticas de 4 cm × 4 cm × 4 cm e alimentadas com 20 µL da solução de bactérias expressando dsNTL (superfície do alimento). Foi observado que a ingestão desta quantidade de dsRNA regulou significativamente a expressão de SINTL em ambos os sexos, e reduziu a taxa de transcritos em até 83%. Apesar de o decréscimo na expressão de *SINTL* não ter afetado significativamente seu desenvolvimento, sobrevivência e morfologia, a mesma afetou significativamente o comportamento reprodutivo dos adultos, incluindo *female calling* (área do ovipositor feminino que contém a glândula de feromônio é extrudada e exposta para o exterior), male courtship (o macho pulando e abanando as asas sobre ou ao redor da fêmea ou se exposição de sua genitália tentando envolver a genitália da fêmea), padrões e taxas de acasalamento e produção reprodutiva (ganho de prole reduzido em mais de 70%) (Wang *et al.*, 2021). As fêmeas alimentadas com dsNLT, por exemplo, mostraram uma taxa de female calling significativamente menor e com menor duração em relação às fêmeas do controle. Ainda, apenas 38% das fêmeas alimentadas com dsNLT acasalaram em sua vida e nenhum re-acasalamento ocorreu nessas fêmeas, sendo a taxa média de acasalamento igual a 0,38 vez por fêmea, enquanto quase todas as fêmeas de controle (92%) acasalaram pelo menos uma vez e algumas delas acasalaram até quatro vezes (taxa média de acasalamento de 1,54) (Wang *et al.*, 2021). Os dados de fecundidade mostraram que as fêmeas de dsNLT colocaram significativamente menos ovos nos primeiros dois dias após o pareamento e ao longo da vida e têm menos descendentes do que as fêmeas de controle (Wang *et al.*, 2021).

Da mesma forma, os machos alimentados com dsNLT mostraram uma taxa de cortejo significativamente menor, menos “namoros”, e menor taxa de acasalamento com fêmeas

selvagens em comparação com machos de controle. Também apresentaram menor taxa de acasalamento ao longo da vida (23% acasalados) e nenhum re-acasalamento ocorreu nesses machos (taxa média de acasalamento é de 0,23 vez por fêmea), enquanto a maioria dos machos controle (77%) acasalou pelo menos uma vez e alguns deles acasalaram até três vezes (taxa de acasalamento média é de 1,54). O teste de fecundidade mostrou que as fêmeas selvagens acasaladas com machos dsNTL colocaram menos ovos nos primeiros dois dias após o pareamento e ao longo da vida e tiveram uma prole significativamente menor do que as de fêmeas selvagens acasaladas com machos de controle (Wang *et al.*, 2021).

No entanto, neste trabalho pudemos observar que o volume de bactéria expressando dsRNA adicionado à dieta artificial, de 50 µL, 65 µL, 80 µL e 100 µL, não influenciou no desenvolvimento das lagartas de *D. saccharalis* pelas variáveis estimadas, ou ainda, não foi responsável por ocasionar efeitos de silenciamento gênico no inseto.

O mesmo gene (*CHI*) foi utilizado para testar os tratamentos com dsRNA em doses distintas. Ao oferecer dsRNA *CHI* em concentração de 250x às lagartas, disposto a suspensão bacteriana na superfície da dieta artificial, foi observado uma mortalidade de 13,79%. Já quando foi oferecida uma concentração de 500x deste mesmo dsRNA, também disposto na superfície da dieta, a mortalidade da fase larval encontrada foi de 6,9%. Apesar de todas as lagartas do controle (Dieta) terem sobrevivido, as taxas de mortalidade larval encontradas nos outros dois tratamentos não foram consideradas muito expressivas (Figura 13). A duração total do ensaio foi de 40 dias.

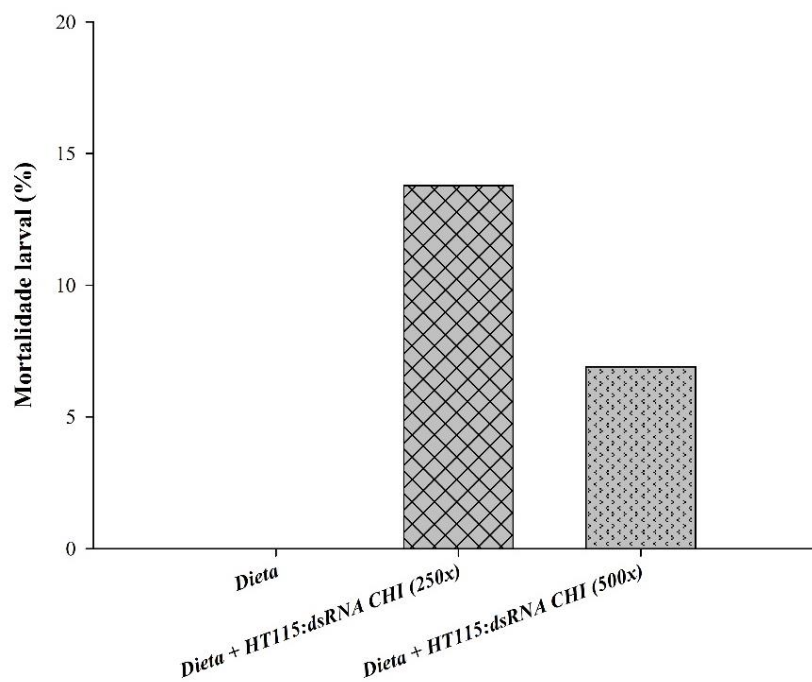


Figura 13. Porcentagem de mortalidade da fase larval de *Diatraea saccharalis* após as lagartas se alimentarem de doses crescentes de dsRNA correspondente ao gene *chitin synthase A (CHI)*, expresso em bactérias *Escherichia coli* HT115 (DE3) dispostas superficialmente na dieta artificial (n=30). A duração do ensaio foi de 36 dias.

Para o parâmetro peso de pupas não foram observadas diferenças entre os tratamentos “dsRNA *CHI* (250x)” e “dsRNA *CHI* (500x)” em comparação ao controle (Dieta), para machos e fêmeas (Figura 14). Em relação à duração da fase larval, diferenças estatísticas significativas foram observadas em ambos os sexos. Para fêmeas, o aumento na duração do ciclo, em torno de 4 dias em relação ao controle, ocorreu em lagartas que se alimentaram de “dsRNA *CHI* (500x)”, enquanto nos machos, houve um aumento de 7 dias na duração do ciclo nas lagartas alimentadas com “dsRNA *CHI* (250x)” (Figura 15). Estes resultados, aparentemente inconsistentes, sugerem ser devido a um efeito ao acaso, e não propriamente a um efeito ocasionado pela molécula de dsRNA fornecida.

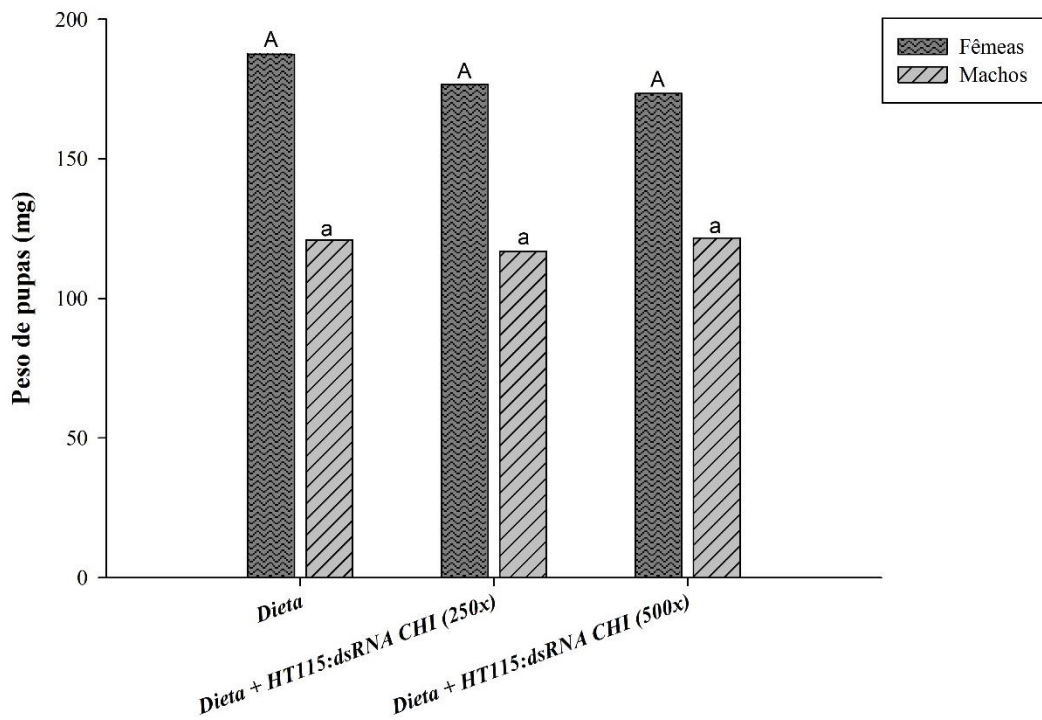


Figura 14. Peso (mg) de pupas fêmeas e machos de *Diatraea saccharalis* após as lagartas se alimentarem de doses crescentes de dsRNA correspondente ao gene *chitin synthase A (CHI)*, expresso em bactérias *Escherichia coli* HT115 (DE3) dispostas superficialmente na dieta artificial (n=30). Barras seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,1$). Macho: $p = 0,7922$; Fêmea: $p = 0,6073$.

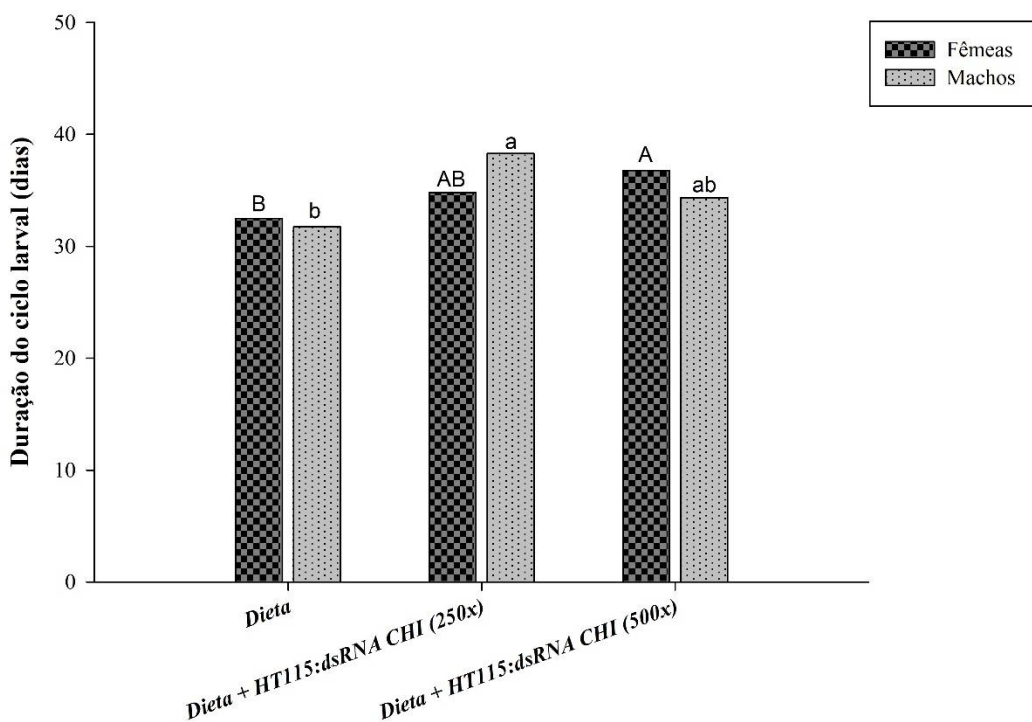


Figura 15. Duração (dias) do ciclo larval de fêmeas e machos de *Diatraea saccharalis* após as lagartas se alimentarem doses crescentes de dsRNA correspondente ao gene *chitin synthase A (CHI)*, expresso em bactérias *Escherichia coli* HT115 (DE3) dispostas superficialmente na dieta artificial (n=30). Barras seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,1$). Macho: $p = 0,01387$; Fêmea: $p = 0,07735$.

Para *H. armigera*, espécie também pertencente à ordem Lepidoptera, foi avaliado o impacto da concentração de dsRNA nos níveis de transcritos do gene *chitinase*. Da mesma forma, os insetos foram alimentados em dieta contendo bactéria expressando a molécula de dsRNA contra o gene-alvo, em diferentes concentrações, por 120 h (Yang & Han, 2014). Distintamente, neste trabalho, foram testadas doses baixas de dsRNA derivados da expressão em bactérias, como 1x, 5x, 25x e 125x. A dose mais baixa, de 1x, teve um pequeno efeito de silenciamento no nível de expressão do gene *chitinase* (8,5%). Quando as lagartas ingeriram suspensão mais concentrada de 5x e 25x, a expressão do gene-alvo reduziu em 41,4% e 62,2%, respectivamente. Entretanto, quando a dose foi aumentada para 125x, não resultou em nenhuma supressão adicional (59,5%). Esses resultados implicam que o dsRNA produzido pela bactéria tem um efeito de dose; no entanto, também há um efeito de saturação sob doses muito elevadas (Yang & Han, 2014).

Em *S. exigua* também foram testadas concentrações de dsRNA expressos em bactérias de 10x, 50x e 250x em suspensão bacteriana utilizadas em ensaios de alimentação dos insetos (Tian *et al.*, 2009). Nesta circunstância, larvas de 4º e 5º instar apresentaram taxa de mortalidade de 88,6% e 74,2%, respectivamente, quando alimentadas com a dose maior de dsRNA. Todavia, não foram encontradas diferenças significativas na duração do ciclo larval em após a ingestão da dose mais elevada de dsRNA. No que diz respeito às demais doses (50x e 10x), não foram obtidas diferenças na taxa de sobrevivência ou na duração do ciclo larval (Tian *et al.*, 2009).

Diante do que foi aqui apresentado, podemos afirmar que para *D. saccharalis* não foram encontradas evidências suficientes que indicaram impacto das doses de dsRNA nas larvas. Além disso, pôde perceber-se que a maior concentração presumível de dsRNA (500x) foi responsável por uma taxa de mortalidade larval menor, quando comparada com a mortalidade causada pela diluição menor de dsRNA (250x). Efeitos similares tiveram sua causa associada ao fato de que altas concentrações de dsRNAs são capazes de iniciar efeitos de saturação da via de RNAi (Galdeano *et al.*, 2017; Yang & Han, 2014).

Ainda assim, há relatos sobre o uso de dose máxima, obtendo sucesso com o silenciamento gênico via RNAi. Este é o caso de lagartas de *H. armigera*, que foram alimentadas com dsRNA expresso em bactérias na dose de 500x, buscando silenciar o gene *ecd50E* receptor, levando a uma redução nos transcritos de 2,7 vezes, atraso no desenvolvimento de 2 a 3 dias, formação de larvas e pupas anormais e atraso na emergência de adultos, além de 20% de mortalidade das pupas (Israni & Rajam, 2017). Percebe-se, no

entanto, que mesmo sendo resultados significativos, a mortalidade ainda assim representou um valor baixo.

Por fim, foi realizado um último experimento a fim de averiguar se essas mesmas diluições de dsRNA testadas, 250x e 500x, poderiam resultar em algum efeito quando a suspensão bacteriana estivesse misturada à dieta artificial, ao invés de ser distribuída somente sobre a superfície da dieta. No tocante a mortalidade larval, lagartas que se alimentaram de dieta contendo “dsRNA *CHI* (500x)” incorporado a dieta, apresentaram 6,7% de mortalidade, enquanto todas as lagartas que se alimentaram dos demais tratamentos (“dsRNA *CHI* (500x)” e Dieta), sobreviveram (Figura 16). O ensaio teve duração total de 40 dias.

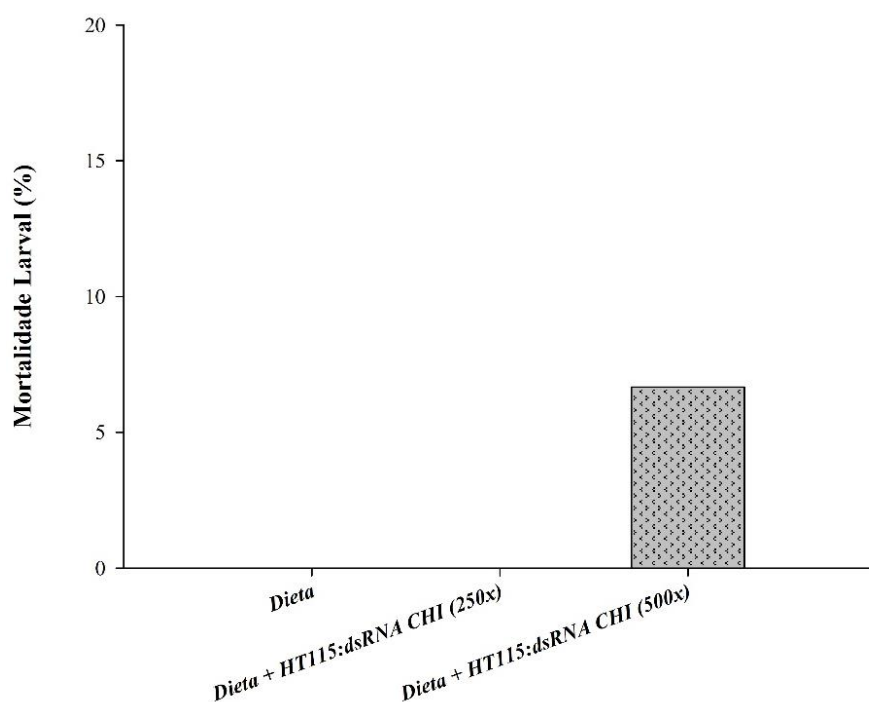


Figura 16. Porcentagem de mortalidade da fase larval de *Diatraea saccharalis* após as lagartas se alimentarem de diferentes doses de dsRNA correspondente ao gene *chitin synthase A (CHI)*, expresso em bactérias *Escherichia coli* HT115 (DE3) misturadas à dieta artificial (n=30). A duração do ensaio foi de 38 dias.

Ao analisar o peso de pupas e a duração do ciclo larval não foram detectadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, tanto para fêmeas como para machos (Figuras 17 e 18). Assim sendo, concluímos que o dsRNA quando misturado à dieta, independentemente da concentração, também não provocou efeitos de silenciamento nos insetos que dele se alimentaram.

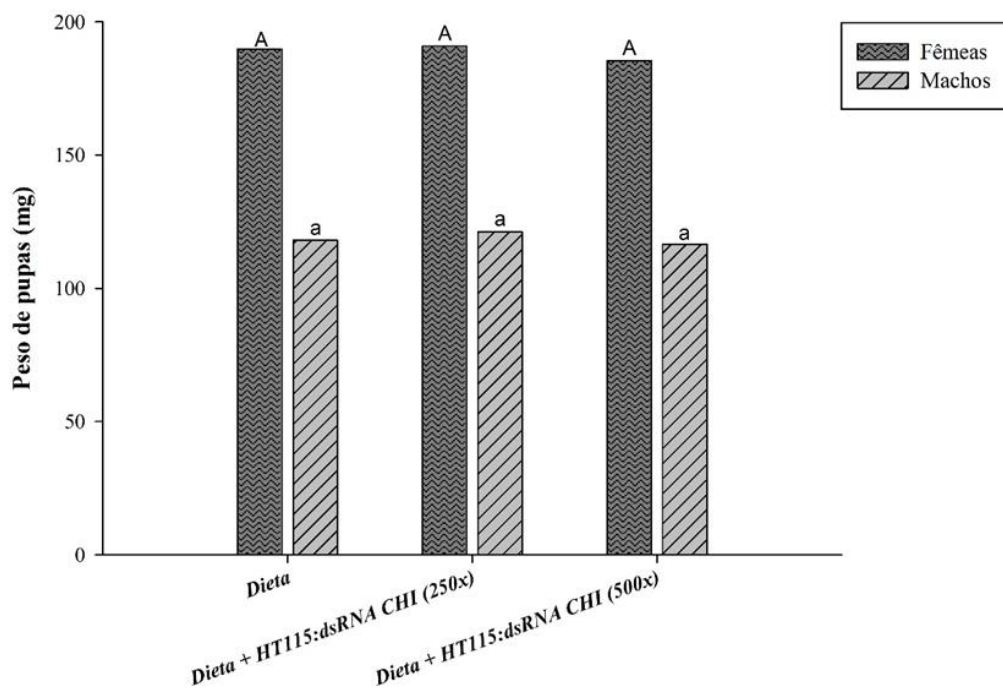


Figura 17. Peso (mg) de pupas fêmeas e machos de *Diatraea saccharalis* após as lagartas se alimentarem de diferentes doses de dsRNA correspondente ao gene *chitin synthase A (CHI)*, expresso em bactérias *Escherichia coli* HT115 (DE3) misturadas à dieta artificial (n=30). Barras seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,1$). Macho: $p = 0,7509$; Fêmea: $p = 0,8257$.

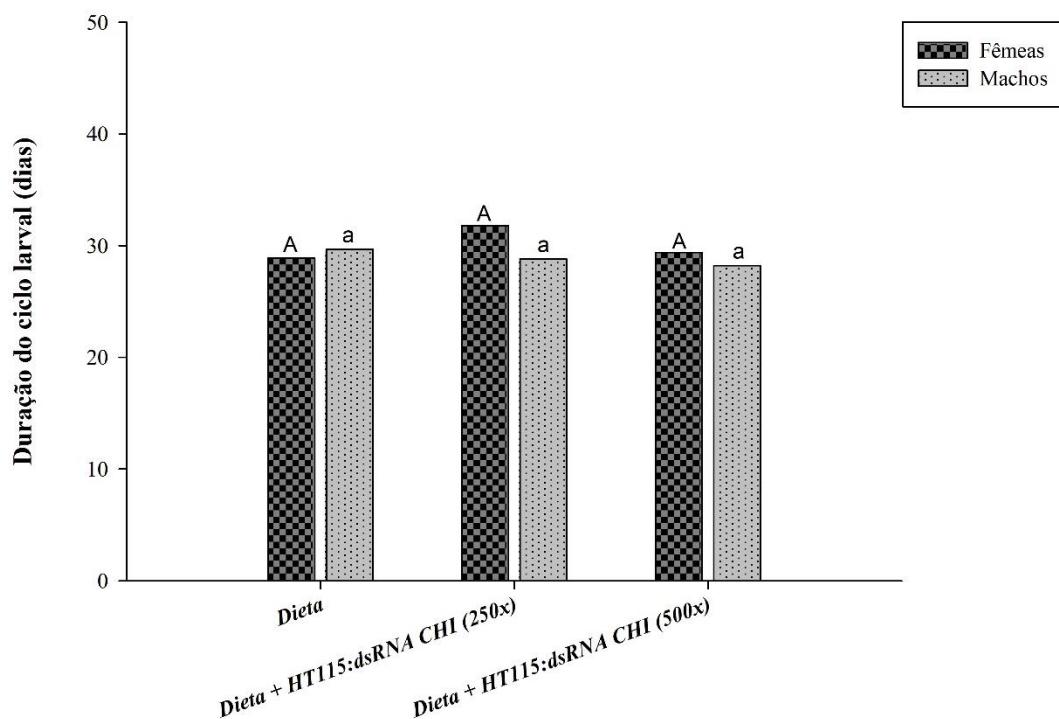


Figura 18. Duração (dias) do ciclo larval de fêmeas e machos de *Diatraea saccharalis* após as lagartas se alimentarem diferentes doses de dsRNA correspondente ao gene *chitin synthase A (CHI)*, expresso em bactérias *Escherichia coli* HT115 (DE3) misturadas à dieta artificial (n=30). Barras seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,1$). Macho: $p = 0,3592$; Fêmea: $p = 0,2386$.

O conjunto destes resultados para os três bioensaios sugeriram ausência de efeitos de silenciamento gênico nas condições testadas. Os resultados indicaram, a princípio, uma ausência de resposta de RNAi pelo inseto *D. saccharalis*, independente do volume de suspensão bacteriana expressando dsRNA adicionado à dieta do inseto, da concentração de dsRNA e do modo de dispor a suspensão bacteriana na dieta. Portanto, podemos concluir que existe um indício de que, possivelmente, a ingestão do dsRNA não está sendo efetiva no desencadeamento do mecanismo de RNAi em lagartas de *D. saccharalis* nas condições avaliadas.

Relatos anteriores demonstram que entre as ordens de insetos praga, Lepidoptera, a qual *D. saccharalis* pertence, é a que apresenta maior dificuldade de resposta a este mecanismo de silenciamento gênico. Trata-se de insetos recalcitrantes ao mecanismo de RNAi. Várias razões para a recalcitrância de lepidópteros tem sido hipotetizadas, incluindo a ocorrência de meio altamente alcalino no intestino, bem como a presença de nucleases que atuam na degradação de dsRNA, agindo em poucos minutos; ou também, o aprisionamento destas moléculas em vesículas endossomais (Zhang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016; Lamontagne *et al.*, 2001; Terenius *et al.*, 2011; Garbutt *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Além disso, a escolha do gene-alvo também pode ser um fator decisivo na eficiência do RNAi em insetos. Para isto, procuramos testar outro gene, o *JHEH*, como alvo de silenciamento em *D. saccharalis*.

3.3.4. Ingestão e acúmulo de bactéria no intestino de lagartas de *D. saccharalis*

Para confirmar que as moléculas de dsRNA expressas nas bactérias estariam sendo ingeridas e alcançarem o intestino larval, um experimento foi conduzido com larvas de primeiro instar de *D. saccharalis* se alimentando de dieta artificial coberta com bactérias *E. coli* HT115 (DE3) transformadas com pL4440: *CHI* e coradas com corante alimentício azul. As bactérias coradas expressando dsRNA foram facilmente detectadas visualmente dentro das lagartas após alimentação (6 h, 12 h e 24 h; Figura 19). Em lagartas de quinto instar, que foram dissecadas 6 h após alimentação em dieta artificial contendo as bactérias azuis, fica evidente a presença desta dieta no intestino das mesmas (Figura 19D). Esses resultados demonstram que as bactérias foram ingeridos pelas lagartas de *D. saccharalis* e acumulados em seus intestinos.

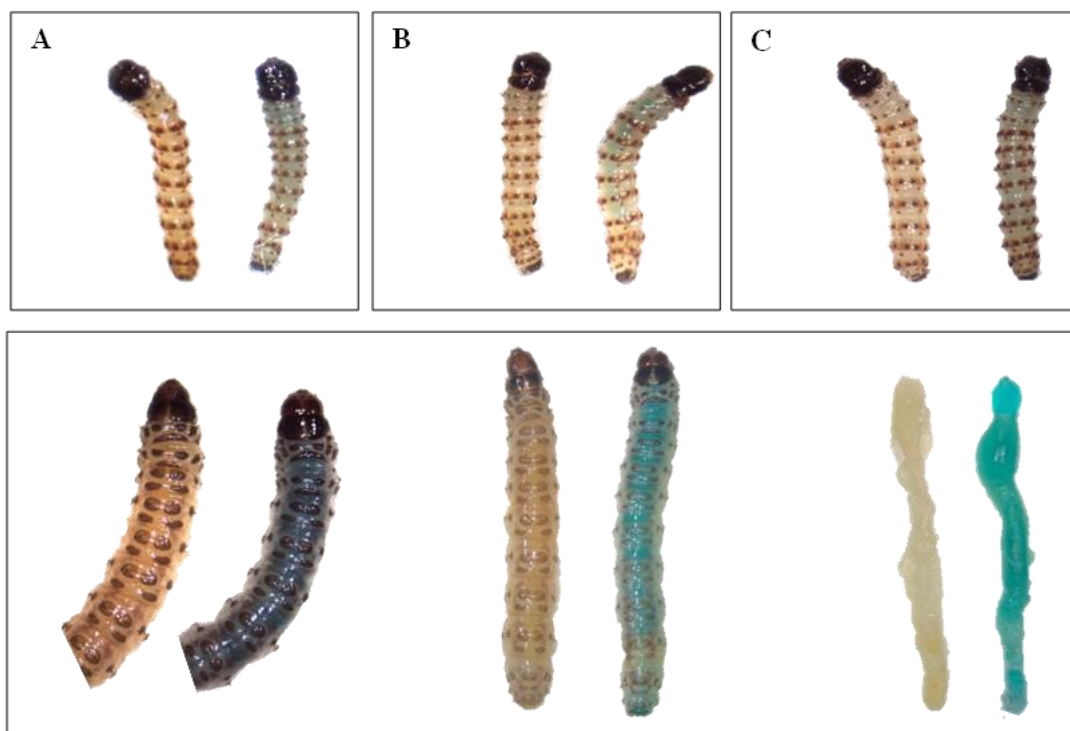


Figura 19. Análise da ingestão e acúmulo da bactéria *E. coli* HT115 (DE3) coloridas com corante azul no intestino da lagarta *Diatraea. saccharalis*. Lagartas de primeiro instar alimentadas somente em dieta artificial (esquerda) e em dieta artificial contendo bactérias expressando dsRNA coradas com corante alimentício azul (direita) em três tempos após alimentação: (A) 6 h, (B) 12 h e (C) 24 h. Lagartas de quinto instar também foram alimentadas somente em dieta artificial (esquerda) e em dieta artificial contendo bactérias expressando dsRNA coradas com corante alimentício azul (direita) 6 h após alimentação foram dissecadas para visualização de seus intestinos (D).

3.3.5. Bioensaio de fornecimento de bactérias *E. coli* HT115 (DE3) transformadas com pL4440: *JHEH* a lagartas de *D. saccharalis*

Buscamos realizar a otimização de parâmetros de bioensaios que visavam o uso de bactérias *E. coli* HT115 (DE3) como método de entrega de dsRNA a lagartas de *D. saccharalis*. No entanto, mesmo alternando diferentes concentrações de dsRNA (100x, 250x e 500x), diferentes volumes de suspensão bacterianas (50 μ L, 65 μ L, 80 μ L e 100 μ L) e diferentes maneiras de adicionar a suspensão bacteriana à dieta artificial (mistura ou distribuída na superfície da dieta), não foram observadas evidências de efeitos de silenciamento gênico, tais como alterações morfológicas larvais, alterações na duração do ciclo larval e no peso de pupa, e mortalidade larval. Todos estes testes haviam sido realizados utilizando o gene-alvo *CHI*, e levantou-se a hipótese de a ausência da resposta RNAi poderia estar relacionada a uma possível baixa eficiência deste gene-alvo, *CHI*. Por isso, foram conduzidos bioensaios utilizando o gene-alvo *Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase* - *JHEH* de *D. saccharalis*. Alguns autores apontam o gene *JHEH* (*Juvenile hormone epoxide*

hydrolase) como sendo o gene biologicamente mais relevante no catabolismo do hormônio Juvenil (Gilbert *et al.*, 2005).

O uso do gene *JHEH* como alvo para o silenciamento gênico de insetos da ordem Lepidóptera tem demonstrado eficiência no controle dos mesmos via RNAi. Para a traça *Lymantria dispar asiática* (Lepidoptera), por exemplo, a ingestão de moléculas de dsRNA produzidas *in vitro* contra o gene *JHEH* foram responsáveis pelo atraso do desenvolvimento larval (Wen *et al.*, 2018). Após a ingestão de dsRNA-*JHEH*, as larvas de terceiro instar examinadas após 12, 36 e 48 h mostraram uma diminuição na abundância de mRNA do gene *Ldjheh1* de 0,28, 0,68 e 0,88 vezes, respectivamente (Wen *et al.*, 2018). A ingestão de dsRNA-*JHEH* atrasou levemente a duração do terceiro instar larval em 0,38 dias, em comparação com o grupo controle de 5,4 dias. Em *T. absoluta* (Lepidoptera), apesar de as larvas tratadas com dsRNA visando *JHEH* não sofrerem um aumento significativo na mortalidade, as mesmas tiveram seus níveis de transcrição reduzidos, assim como a duração do ciclo larval (Bento *et al.*, 2020). A redução significativa no acúmulo de transcritos de *JHEH* em larvas alimentadas com dsRNA de *JHEH* em comparação com o controle negativo foi de 78,9% (Bento *et al.*, 2020). O mesmo pôde ser observado em *Plutella xylostella* (Lepidoptera:Plutellidae), cujas larvas foram tratadas com doses crescentes de dsRNA contra o gene *JHEH* (dsJHEH). Neste caso, a taxa de mortalidade foi registrada em quatro intervalos de 24, 48, 72 e 96 h em comparação com cinco concentrações de dsRNA, sendo elas 1, 2, 5, 10 e 20 µg/µL (Chaitanya *et al.*, 2017). No tratamento com dsJHEH a mortalidade aumentou com o aumento da concentração de dsRNA. No tempo de 96 h pós-tratamento com dsJHEH, a mortalidade resultou em 66,66% com a dose de 20µg / µL de dsRNA (Chaitanya *et al.*, 2017).

Desta forma, resolvemos testar o efeito da entrega de dsJHEH, expresso em HT115 (DE3), a lagartas de *D. saccharalis*. Ao oferecer dsJHEH em concentração de 250x às lagartas, dispendo a suspensão bacteriana na superfície da dieta artificial, foi observado uma mortalidade de 11,1%. Nas lagartas alimentadas com HT115 transformada com o vetor de silenciamento pL4440 vazio, isto é, sem a inserção do gene-alvo para produção de dsRNA, a mortalidade também foi de 11,1% e no controle (somente dieta artificial, sem adição de bactéria), a taxa de mortalidade foi de 5,55%. Desta forma, a ingestão de dsRNA correspondente ao gene-alvo *JHEH* não se mostrou efetiva no quesito mortalidade das lagartas (Figura 20).

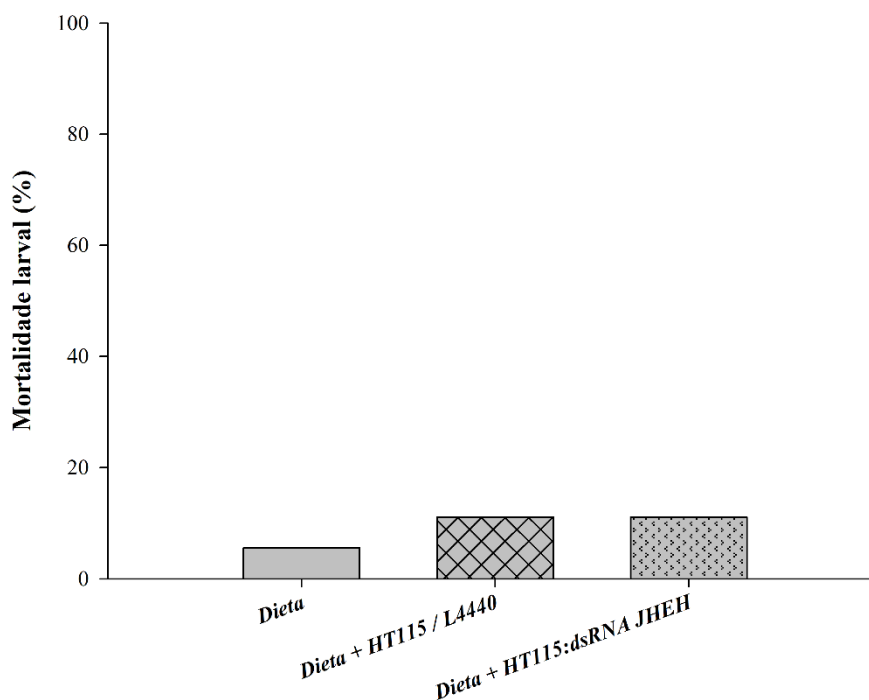


Figura 20. Porcentagem de mortalidade da fase larval de *Diatraea saccharalis* após as lagartas se alimentarem de doses crescentes de dsRNA correspondente ao gene *juvenile hormone epoxide hydrolase (JHEH)*, expresso em bactérias *Escherichia coli* HT115 (DE3) dispostas superficialmente na dieta artificial (n=30). A duração do ensaio foi de 45 dias.

Para o parâmetro peso de pupas não foram observadas diferenças entre o tratamento dsRNA *JHEH* em comparação aos tratamentos controle (dieta) e adição de bactéria contendo vetor vazio (pL4440), tanto para pupas machos como para fêmeas (Figura 21). Em relação à duração da fase larval, diferenças estatísticas significativas foram observadas para fêmeas no tratamento dsJHEH, no qual foi observado um aumento na duração do ciclo, em torno de 3 dias, em relação ao controle somente dieta e ao tratamento com adição de bactéria contendo o vetor vazio. Apesar de existir, essa diferença, ainda mais sendo encontrada somente para o sexo feminino, não é considerada expressiva em termos de evidência de ocorrência de silenciamento gênico. Para machos, não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 22).

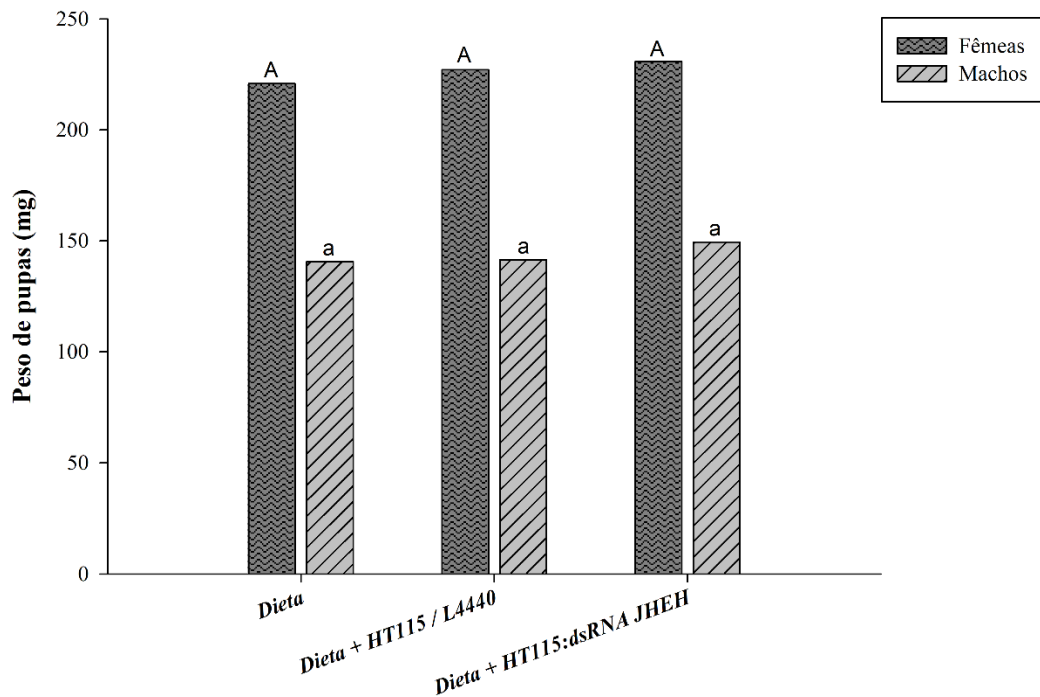


Figura 21. Peso (mg) de pupas fêmeas e machos de *Diatraea saccharalis* após as lagartas se alimentarem de dsRNA correspondente ao gene *juvenile hormone epoxide hydrolase (JHEH)*, expresso em bactérias *Escherichia coli* HT115 (DE3) dispostas superficialmente na dieta artificial (n=30). Barras seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,1$). Macho: $p = 0,5992$; Fêmea: $p = 0,8128$.

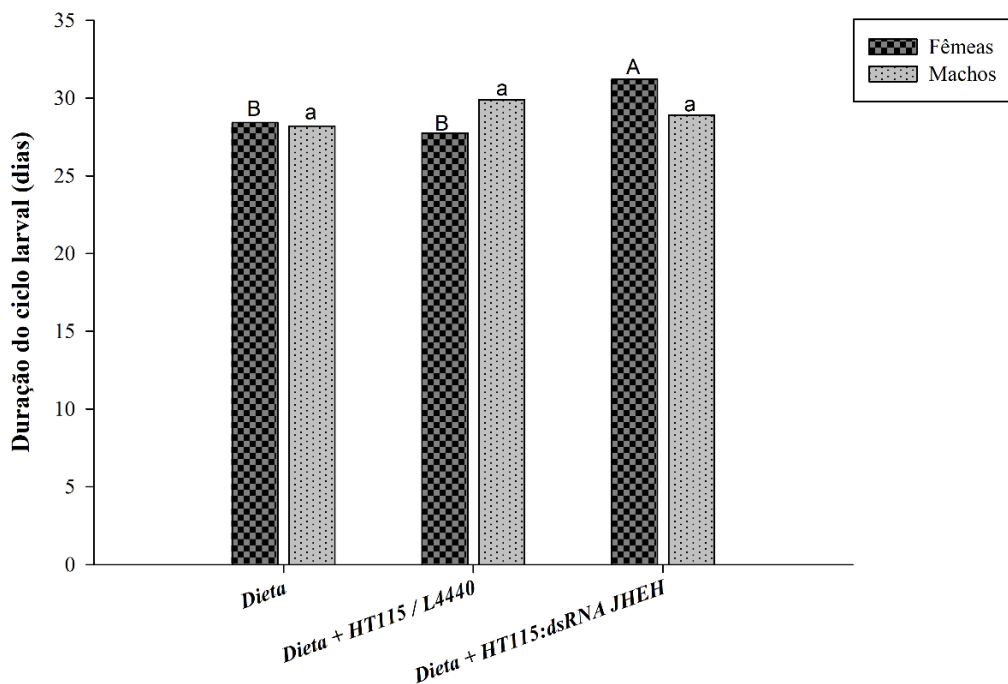


Figura 22. Duração (dias) do ciclo larval de fêmeas e machos de *Diatraea saccharalis* após as lagartas se alimentarem doses crescentes de dsRNA correspondente ao gene *juvenile hormone epoxide hydrolase (JHEH)*, expresso em bactérias *Escherichia coli* HT115 (DE3) dispostas superficialmente na dieta artificial (n=30). Barras seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,1$). Macho: $p = 0,4872$; Fêmea: $p = 0,02369^*$.

Portanto, a partir dos resultados aqui apresentados, fica nítido que esta espécie *D. saccharalis*, similar a demais da ordem Lepidóptera, apresenta recalcitrância ao mecanismo de RNAi. É sabido, que a capacidade dos insetos de adquirir dsRNA através da alimentação (ou seja, RNAi ambiental) determina o uso potencial da tecnologia RNAi para o manejo de pragas de insetos. No entanto, as ordens de insetos respondem de maneira diferente ao dsRNA. Dos vários insetos estudados até o momento, os coleópteros são, em geral, altamente sensíveis ao RNAi, enquanto Hemiptera, Orthoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera apresentam diferentes níveis de variabilidade em suas respostas. Múltiplos mecanismos parecem afetar a eficiência do RNAi em diferentes espécies de insetos, incluindo: (1) instabilidade do dsRNA antes ou no interior do inseto; (2) internalização insuficiente de dsRNA; (3) maquinaria de RNAi deficiente; (4) disseminação sistêmica prejudicada; e (5) alvos de genes refratários. Não há apenas diferenças nas respostas entre as ordens, mas também dentro das espécies, estágios de vida, tecidos e genes (Terenius *et al.*, 2011; Wynant *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2017; Vogel *et al.*, 2018; Cooper *et al.*, 2019; Grover *et al.*, 2019; Christiaens *et al.*; 2020).

Especificamente em lepidópteros, a recalcitrância ao RNAi, ou ainda, a baixa resposta ao mecanismo de silenciamento gênico via RNAi tem sido explicada por alguns fatores, como pH fisiológico do trato digestório, aprisionamento do dsRNA nos endossomos, expressão de mRNA de genes da maquinaria central RNAi, *overlapping* das diferentes vias de RNAi (siRNA, miRNA e piRNA), infecções virais e liberação de supressores virais e presença nucleases que degradam dsRNA.

Primeiramente, o pH fisiológico pode afetar a estabilidade do dsRNA e a atividade enzimática das nucleases. O RNA é mais estável entre a faixa de pH de 4-5 (ambiente ácido), sendo que qualquer variação dessa faixa pode resultar em sua hidrólise (em $\text{pH} > 6,0$ e $< 2,0$) ou depuração ($< 3,0$), levando à sua degradação (Bernhardt & Tate 2012; Cooper *et al.*, 2019). Ortópteros, dípteros e himenópteros geralmente têm intestinos médios alcalinos, já coleópteros e hemípteros têm intestino médio ligeiramente ácido (Cooper *et al.*, 2018). Lepidópteros por sua vez, apresentam pH do conteúdo intestinal extremamente alcalino, variando de pH 9,0 a 12,0 (Harrison, 2001). Esta alcalinidade está provavelmente relacionada com a adaptação à fitofagia pelos insetos, pois o alto pH é necessário para digestão da hemicelulose da parede celular vegetal (Terra *et al.*, 1987). Sendo assim, por essa elevada alcalinidade em seu lúmen intestinal, o dsRNA acaba sofrendo hidrólise, não permitindo que atue no silenciamento gênico RNAi no inseto. Além disso, os tecidos intestinais dos insetos contêm várias dsRNases. Essas dsRNases são mais ativas em pH alcalino, enquanto sua

atividade é suprimida em meio ácido e neutro (Peng *et al.* 2018). Assim, sabendo que o lúmen intestinal de hemípteros e coleópteros é mais ácido e que em lepidópteros é altamente alcalino, suporta a maior estabilidade do dsRNA no intestino de insetos hemípteros e coleópteros e menor estabilidade em lepidópteros (Christiaens & Smagghe 2014; Peng *et al.*, 2018). Isso sugere que as diferenças no pH intestinal contribuem para a baixa eficiência do RNAi oral, influenciando a atividade da dsRNase, bem como possivelmente através da hidrólise do dsRNA em lepidópteros (Figura 23).

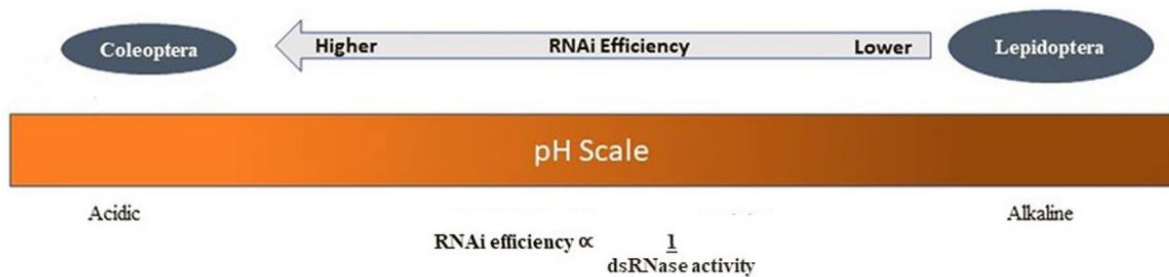


Figura 23. Representação esquemática das condições de pH intestinal em duas grandes ordens de insetos (Coleoptera e Lepidoptera), que representam dois extremos em relação à eficiência de RNAi exibida por eles. Choudhary *et al.*, 2021.

Outro fator apontado como uma das causas da recalcitrância ao RNAi em lepidópteros é o transporte intracelular ineficiente das moléculas de dsRNA, ou ainda, o aprisionamento das mesmas nos endossomos. Em *Caenorhabditis elegans*, a captação celular no intestino e o transporte intercelular de dsRNA são mediados pelas proteínas SID2 e SID1 (*systemic RNAi defective*), respectivamente (Whangbo *et al.*, 2008; Zhu & Palli, 2020). SID2, uma proteína transmembrana de passagem única que se liga ao dsRNA no intestino e internaliza o dsRNA (mais de 50 pb de comprimento) por meio de endocitose mediada por receptor, enquanto Sid1, é uma proteína transmembrana de passagem múltipla, atuando como um canal que permite a entrada de dsRNA na célula (Whangbo *et al.*, 2008). A presença de homólogos de Sid1 em insetos (conhecidos como genes *Sid1-like* ou *Sil*) já foi identificada, mas o envolvimento deste mecanismo de captação no RNAi dos insetos varia consideravelmente. Além disso, embora os genes *Sil* estejam presentes na maioria dos insetos, não existem relatos de homólogos de *Sid2* (Baum *et al.*, 2014; Cooper *et al.*, 2018). A partir disto e juntamente com demais estudos, ficou demonstrado que a endocitose dependente de clatrina e macropinocitose são os dois principais mecanismos envolvidos na captação de dsRNA em

insetos (Saleh *et al.*, 2006; Wynant *et al.*, 2012). O dsRNA captado pelas células através de clatrina-dependente e outras vias de endocitose é transportado através de endossomos para os locais citoplasmáticos (Zhu & Palli, 2020). Após ser internalizado através de endocitose dependente de clatrina mediada por receptor, o revestimento de clatrina é removido da vesícula, que então se funde com um endossoma inicial. Os endossomos iniciais então se fundem para formar vesículas luminais internas conhecidas como corpos multivesiculares ou endossomos tardios. Endossomos tardios maduros eventualmente se fundem com lisossomos, e a carga é degradada. Portanto, o dsRNA deve escapar dos endossomos para alcançar a maquinaria central da via do RNAi no citoplasma (Xiao *et al.*, 2015; Cooper *et al.*, 2018). Em coleópteros, como *Tribolium castaneum* e *Leptinotarsa decemlineata*, onde o RNAi é eficiente, o dsRNA é entregue normalmente ao citoplasma, onde é convertido em siRNA (Shukla *et al.*, 2016). Em contraste, em lepidópteros, como *Heliothis virescens* e a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda*, onde o RNAi não funciona de forma eficiente, o transporte intracelular é ineficiente e a maior parte do dsRNA não é capaz de escapar dos endossomos e, portanto, não é convertido em siRNA (Shukla *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2017) (Figura 24). Moléculas de dsRNA marcadas com fluorescência foram internalizadas igualmente em células de linhagens celulares de lepidópteros (Sf9 e Hv-E6) e coleópteros (Lepd-SL1 e TcA). No entanto, em células de lepidópteros, o dsRNA nunca foi convertido em siRNAs, como ocorre em células de coleópteros, indicando que o dsRNA provavelmente foi degradado nos lisossomos e o escape endossomal pode estar limitando a eficiência do RNAi em lepidópteros (Shukla *et al.*, 2016). Experimentos mostrando co-localização de dsRNAs com endossomos precoces e tardios, mas não lisossomos, em células de lepidópteros são consistentes com essa hipótese (Shukla *et al.*, 2016). Investigações posteriores mostraram que o dsRNA é convertido em siRNA após alimentação e injeção em 12 espécies de coleópteros e duas espécies de ortópteros, mas não é convertido em siRNA em nenhuma das dez espécies de lepidópteros avaliadas (Singh *et al.*, 2017). Esses dados suportam a hipótese de que o escape endossomal é um fator limitante especialmente em lepidópteros, possivelmente em alguns hemípteros e dípteros, mas não em coleópteros ou ortópteros.

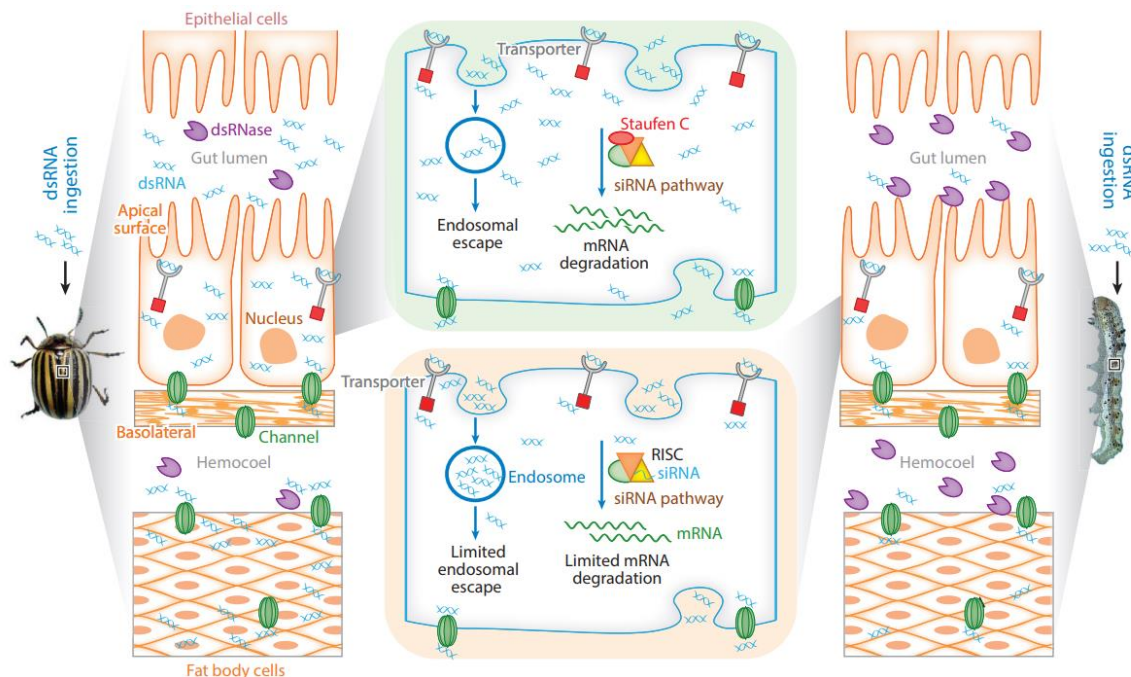


Figura 24. Comparação da capturação, transporte intracelular e processamento de dsRNA em insetos coleópteros (RNAi-eficientes) e lepidópteros (RNAi-ineficientes). Nos coleópteros (esquerda), o dsRNA ingerido é absorvido pelas células epiteliais do intestino através de endocitose dependente de clatrina e outros transportadores de dsRNA. O dsRNA é então liberado no citoplasma e não há grande acúmulo de dsRNA nos endossomos (Shukla et al., 2016). O dsRNA no citoplasma é processado em siRNA para desencadear o RNAi. Parte do dsRNA é exportado para a hemocele e levado por tecidos como o corpo gorduroso, onde o RNAi é induzido. Em contraste, em lepidópteros, parte do dsRNA ingerido é degradado por dsRNases, e o restante é absorvido pelas células epiteliais do intestino. A maior parte do dsRNA é capturada pelos endossomos e, portanto, não é processada eficientemente em siRNA, resultando em RNAi ineficiente (Yoon et al., 2017). Alguns dos dsRNA também podem ser exportados para a hemocele, mas as dsRNases na hemocele degradam a maior parte do dsRNA, resultando em transporte ineficiente para os tecidos, como o corpo gorduroso. Além disso, uma proteína de ligação de RNA, Staufen C, que está envolvida no processamento de dsRNA em siRNA para iniciar o RNAi, foi detectada até agora apenas em coleópteros e não em outros insetos (Yoon et al., 2018). Abreviaturas: dsRNA, RNA de fita dupla; RISC, complexo de silenciamento induzido por RNA; RNAi, interferência de RNA; siRNA, RNA interferente curto/pequeno. Figura retirada de Zhu & Palli, 2020.

A expressão de mRNA de genes da maquinaria central RNAi também pode explicar as diferenças na eficiência de RNAi entre diferentes ordens de insetos. Para testar essa hipótese, Davis-Vogel *et al.* (2018) avaliaram oito proteínas das vias de siRNA e miRNA entre três pragas agrícolas de três ordens: *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) e *Nezara viridula* (Hemiptera). Neste estudo, os pesquisadores compararam os níveis de transcrição das proteínas da maquinaria central *Drosha*, *Dcr-1*, *Dcr-2*, *Pasha*, *Loquacious*, *R2D2*, *Ago-1* e *Ago2* entre as três espécies. A comparação direta das proteínas nos três insetos revelou que *D. v. virgifera*, um inseto com uma resposta de RNAi robusta, teve um aumento na expressão de *Loquacious* (Davis-Vogel *et al.*, 2018). Curiosamente, o gene que codifica a proteína R2D2 foi encontrado duplicado em muitos coleópteros (Singh *et al.*, 2017), mas sua expressão foi indetectável no transcriptoma de alguns lepidópteros (Ditrysia) (Dowling *et al.*, 2016). Em outro estudo, a baixa expressão do

gene *R2D2* foi sugerida como uma das razões para a insensibilidade da linha celular ovariana de *Bombyx mori* ao RNAi (Swevers *et al.*, 2011). Além disso, *S. frugiperda* (células Sf21) é a única espécie relatada que não possui gene *Ago2* (Ghosh *et al.*, 2014). Portanto, a perda ou baixa expressão de enzimas *core* de siRNA em Lepidoptera pode explicar parcialmente as diferenças na eficiência do RNAi entre as espécies. Pode ser que os níveis de expressão das enzimas de RNAi do núcleo sejam mais importantes do que o número de cópias do gene de cada enzima de RNAi, embora o aumento das cópias do gene possa resultar em maior expressão das enzimas. Assim, alguns especularam que alguns insetos têm respostas de RNAi ineficientes devido à baixa regulação positiva das enzimas de RNAi do núcleo (Terenius *et al.*, 2011; Kolliopoulou & Swevers *et al.*, 2016). Esses estudos sugerem que a expressão gênica diferencial de genes de maquinaria central pode influenciar a resposta de RNAi em insetos, mas são necessárias mais evidências (Christiaens *et al.*, 2020).

A sobreposição das vias de RNAi (siRNA, miRNA e piRNA) também têm sido apontada como uma possível causa para a baixa eficiência RNAi em insetos da ordem Lepidoptera. Além da via de siRNA, existem duas vias de RNAi adicionais, a vias de miRNA, que regula principalmente a expressão de genes endógenos usando miRNAs derivados de DNA genômico para direcionar mRNA para degradação; e a via de piRNA, a qual está envolvida na defesa contra elementos transponíveis e envolve a degradação de elementos transponíveis para produzir piRNAs primários, que são então usados para direcionar elementos transponíveis complementares para degradação e geração de piRNAs secundários (Dowling *et al.*, 2016). Se enzimas de mais de uma via de RNAi estiverem envolvidas na resposta de RNAi, isso pode influenciar a eficiência de RNAi nos insetos. Além disso, se houver sobreposição entre as vias de RNAi em alguns insetos, mas não em outros, isso poderia contribuir para diferenças na eficiência do RNAi entre os insetos. Estudos realizados em *B. mori* demonstraram que a proteína Ago2 da via de siRNA participa também das vias de miRNA e piRNA. Ainda em *B. mori*, todos os genes *Ago*, exceto o da via Piwi, são expressos em níveis muito baixos (Nie *et al.*, 2013). Isso sugere que a expressão de enzimas de RNAi do núcleo pode ser limitante, ainda mais quando se referem a enzimas que se envolvem em múltiplas vias. Assim, sugere-se que a sobreposição de membros componentes entre as três vias de RNAi pode ser um mecanismo limitante à resposta ao RNAi.

Outro fator que tem sido descrito para interferir na eficiência de RNAi é a presença de vírus no inseto alvo (Christiaens & Smaghe, 2014). Como a via de RNAi é um mecanismo de defesa antiviral, a presença de vírus pode influenciar a disponibilidade do maquinário central.

Durante a corrida evolutiva entre vírus e insetos, os vírus desenvolveram supressores virais de RNAi para combater e desarmar a via de interferência do siRNA nos insetos (Haasnoot *et al.*, 2007). Os supressores virais de RNAi, que são uma variedade de proteínas não caracterizadas ou sem estruturas conservadas, têm como alvo várias etapas na via do RNAi (Obbard *et al.*, 2006). Os principais modos de ação dos supressores virais de RNAi são: (i) ligação de dsRNA que impede a clivagem por Dcr2; (ii) ligação ao siRNA, impedindo seu carregamento em RISC; (iii) degradação de siRNA e; (iv) interação direta com Dcr2 ou Ago2, impedindo a ação destas enzimas (Obbard *et al.*, 2006; Cooper *et al.*, 2018). Os supressores virais de RNAi podem combinar vários modos de ação e vírus individuais podem expressar um ou mais supressores virais de RNAi. No entanto, vale ressaltar que nem todos os vírus expressam supressores virais de RNAi ou mesmo induzem *upregulation* das principais enzimas de RNAi (Obbard *et al.*, 2009; Obbard *et al.*, 2006).

Curiosamente, a eficiência do RNAi entre as ordens de insetos está correlacionada com a prevalência de infecções virais em cada ordem (Swevers *et al.*, 2013). A maioria dos vírus de insetos conhecidos atacam lepidópteros e, em menor grau, dípteros, ambos refratários ao RNAi. Por outro lado, coleópteros, himenópteros, ortópteros e blatídeos apresentam níveis muito baixos de infecções virais, e possuem respostas de RNAi robustas (Swevers *et al.*, 2013). É possível ainda, que uma resposta de RNAi funcional possa ter sido selecionada em insetos caracterizados por altas cargas virais, que acabaram desenvolvendo mecanismos de defesa viral alternativos e que não podem ser superados por supressores virais de RNAi. Exemplos destes mecanismos seriam superexpressão de genes dsRNase ou regulação negativa de vias de entrada viral (Obbard *et al.*, 2009).

Finalmente, outro fator limitante e de destaque em lepidópteros é a presença de nucleases que afetam a eficácia do RNAi nesses organismos. As ribonucleases de fita dupla (dsRNases) pertencem à família de endonucleases específicas. Uma vez que o inseto tenha consumido o dsRNA, o dsRNA deve evitar a degradação por estas nucleases que estão presentes na hemolinfa e no intestino médio do inseto, além da saliva (Zhang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015a; Xu *et al.*, 2016; Lamontagne *et al.*, 2001; Terenius *et al.*, 2011; Garbutt *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2020). Estas dsRNases presentes atuam especificamente na degradação do dsRNA ingerido, conseqüentemente diminuindo as chances de silenciamento do gene alvo (Choudhary *et al.*, 2021). A expressão de genes dsRNase é influenciada por vários fatores. Em alguns casos, a exposição ao dsRNA exógeno aumenta a expressão do gene dsRNase, sugerindo que as dsRNases podem ser um mecanismo de defesa viral, enquanto em outros, a expressão do gene dsRNase varia de acordo com o estágio da

vida e em resposta à fome. Essas observações sugerem que as variações na eficiência do RNAi entre os estágios da vida ou em resposta a diferentes métodos de entrega ou protocolos experimentais podem ser em parte devido a dsRNases (Cooper *et al.*, 2018).

Vários estudos confirmaram a degradação do dsRNA por uma ou mais dsRNases presentes em insetos (Choudhary *et al.*, 2021). Pesquisas realizadas com a lagarta do tabaco, *Manduca sexta* demonstraram que o dsRNA se degrada na hemolinfa após 1 h de exposição (Garbutt *et al.*, 2013). Em *B. mori*, o dsRNA se degrada em apenas dez minutos de exposição às nucleases do intestino médio (Liu *et al.*, 2013; Arimatsu *et al.* 2007). Cinco dsRNases foram relatadas na lagarta do tabaco, *Spodoptera litura*, das quais três foram encontradas expressas no intestino médio, indicando as atividades específicas do tecido de dsRNases (Peng *et al.* 2018, 2020). Os genes REase também mostraram ser regulados positivamente após a exposição ao dsRNA, e a supressão dessas enzimas em *O. furnacalis* aumentou a estabilidade do siRNA *ex vivo*. Além disso, a supressão de genes REase mediada por RNAi em *O. furnacalis* aumentou a eficiência de RNAi (Guan *et al.*, 2018). Esses achados apoiam a ideia de que as REases contribuem para as limitações da eficiência do RNAi em lepidópteros.

3.4. Conclusões

Os resultados apresentados neste capítulo, obtidos a partir de bioensaios que visavam validar a utilização de bactérias *E. coli* HT115 (DE3) como método de entrega de dsRNA a lagartas de *D. saccharalis*, a fim de realizar o controle deste inseto-praga via RNAi, demonstraram que independente da concentração ou dose de dsRNA fornecido ao inseto (100x, 250x e 500x); do volume de suspensão de células bacterianas expressando dsRNA adicionado à dieta artificial da qual o inseto se alimenta 50 µL, 65 µL, 80 µL e 100 µL; da maneira como a suspensão bacteriana é adicionada à dieta, na superfície ou misturada à dieta; e do gene-alvo escolhido (*CHI* ou *JHEH*), não houve evidências de efeitos de silenciamento gênico, como alterações morfológicas larvais, alterações na duração do ciclo larval e no peso de pupa, e mortalidade larval.

Logo, presume-se que de fato, tal qual ocorre na maioria dos insetos da ordem Lepidoptera, a espécie *D. saccharalis* apresenta uma recalcitrância aos mecanismos de RNAi. Essa baixa resposta pode ser explicada por diversos fatores como degradação do dsRNA pelo pH alcalino do trato digestivo destes insetos, aprisionamento destas moléculas em vesículas endossomais, ação de nucleases no trato digestivo, entre outros. Posto isto, o próximo capítulo deste trabalho compreende justamente a investigação da ocorrência e ação de nucleases que atuam na degradação de dsRNA e interferem na resposta ao silenciamento gênico de *D.*

saccharalis, que podem explicar os resultados aqui apresentados.

Referências

- Agrawal, S., Kelkenberg, M., Begum, K., Steinfeld, L., Williams, C. E., Kramer, K. J., ... & Merzendorfer, H. (2014). Two essential peritrophic matrix proteins mediate matrix barrier functions in the insect midgut. *Insect biochemistry and molecular biology*, 49, 24-34.
- Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Specht, C. A., Tomoyasu, Y., Lorenzen, M. D., ... & Beeman, R.W. (2005). The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect molecular biology*, 14, 453-463.
- Arakane, Y., Specht, C. A., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S., & Beeman, R. W. (2008). Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 38, 959-962.
- Araújo, S. J., Aslam, H., Tear, G., & Casanova, J. (2005). *mummy/cystic* encodes an enzyme required for chitin and glycan synthesis, involved in trachea, embryonic cuticle and CNS development—analysis of its role in *Drosophila* tracheal morphogenesis. *Developmental biology*, 288, 179-193.
- Balabanidou, V., Grigoraki, L., & Vontas, J. (2018). Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current opinion in insect science*, 27, 68-74.
- Bardella, D.Z. Silenciamento gênico via RNAi visando o controle da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). 2015. 80 p. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.
- Baum, J. A., & Roberts, J. K. (2014). Progress towards RNAi-mediated insect pest management. In *Advances in insect physiology* (Vol. 47, pp. 249-295). Academic Press.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the royal statistical society. Series B (Methodological)*, 289-300.
- Bento, F. M. M. Silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi) em traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) utilizando bactérias expressando dupla-fita de RNA (dsRNA) 2017. 150 p. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.
- Bento, F. M., Marques, R. N., Campana, F. B., Demétrio, C. G., Leandro, R. A., Parra, J. R. P., & Figueira, A. (2020). Gene silencing by RNAi via oral delivery of dsRNA by bacteria in the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *Pest Management Science*, 76, 287-295.
- Bernhardt, H. S., & Tate, W. P. (2012). Primordial soup or vinaigrette: did the RNA world evolve at acidic pH?. *Biology direct*, 7, 1-12.
- Burse, A., Schmidt, A., Frick, S., Kuhn, J., Gershenzon, J., & Boland, W. (2007). Iridoid biosynthesis in *Chrysomelina* larvae: Fat body produces early terpenoid precursors. *Insect biochemistry and molecular biology*, 37, 255-265.
- Chaitanya, B. N., Asokan, R., Sita, T., Rebijith, K. B., Kumar, P. R., & Kumar, N. K. (2017). Silencing of JHEH and EcR genes of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) through double stranded RNA oral delivery. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20, 637-643.
- Chapman, R. F., Simpson, S. J., Douglas, A. E. (2013). *Insect structure and function*. Cambridge University Press, Cambridge. 954p.

- Chen, X., Tian, H., Zou, L., Tang, B., Hu, J., & Zhang, W. (2008). Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. *Bulletin of Entomological Research*, 98, 613-619.
- Chen, X., Yang, X., Kumar, N. S., Tang, B., Sun, X., Qiu, X., ... & Zhang, W. (2007). The class A chitin synthase gene of *Spodoptera exigua*: Molecular cloning and expression patterns. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 409-417.
- Choudhary, C., Meghwanshi, K. K., Shukla, N., & Shukla, J. N. (2021). Innate and adaptive resistance to RNAi: a major challenge and hurdle to the development of double stranded RNA-based pesticides. *3 Biotech*, 11, 1-20.
- Christiaens, O., & Smagghe, G. (2014). The challenge of RNAi-mediated control of hemipterans. *Current Opinion in Insect Science*, 6, 15-21.
- Christiaens, O., Whyard, S., Vélez, A. M., & Smagghe, G. (2020). Double-stranded RNA technology to control insect pests: Current status and challenges. *Frontiers in plant science*, 11, 451.
- Cooper, A. M., Silver, K., Zhang, J., Park, Y., & Zhu, K. Y. (2019). Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest Management science*, 75, 18-28.
- Davis-Vogel, C., Van Allen, B., Van Hemert, J. L., Sethi, A., Nelson, M. E., & Sashital, D. G. (2018). Identification and comparison of key RNA interference machinery from western corn rootworm, fall armyworm, and southern green stink bug. *PLoS One*, 13, e0203160.
- Dowling, D., Pauli, T., Donath, A., Meusemann, K., Podsiadlowski, L., Petersen, M., ... & Niehuis, O. (2016). Phylogenetic origin and diversification of RNAi pathway genes in insects. *Genome biology and evolution*, 8, 3784-3793.
- Festucci-Buselli, R. A., Contim, L. A., Barbosa, L. C. A., Stuart, J., & Otoni, W. C. (2008). Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone—a review. *Botany*, 86, 978-987.
- Firmino, A. A. P., de Assis Fonseca, F. C., de Macedo, L. L. P., Coelho, R. R., de Souza Jr, J. D. A., Togawa, R. C., ... & Grossi-de-Sa, M. F. (2013). Transcriptome analysis in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA interference in insect pests. *PloS one*, 8, e85079.
- Galdeano, D. M., Breton, M. C., Lopes, J. R. S., Falk, B. W., & Machado, M. A. (2017). Oral delivery of double-stranded RNAs induces mortality in nymphs and adults of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *PloS one*, 12, e0171847.
- Gan, D., Zhang, J., Jiang, H., Jiang, T., Zhu, S., & Cheng, B. (2010). Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. *Plant cell reports*, 29, 1261-1268.
- Garbutt, J.S.; Bellés, X.; Richards, E.H.; Reynolds, SE. (2013). Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymphs a potential determiner of RNA interference success: evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*. *J of Ins Phys*, 59: 171–178.
- Ghosh, S., Kakumani, P. K., Kumar, A., Malhotra, P., Mukherjee, S. K., & Bhatnagar, R. K. (2014). Genome wide screening of RNAi factors of Sf21 cells reveal several novel pathway associated proteins. *BMC genomics*, 15, 1-23.
- Gilbert, L. I., Granger, N. A., & Roe, R. M. (2000). The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect biochemistry and molecular biology*, 30, 617-644.
- Gilbert, L. I., Iatrou, K., & Gill, S. S. (2005). *Comprehensive molecular insect science*. Elsevier. 198p.
- Grover, S., Jindal, V., Banta, G., Taning, C. N. T., Smagghe, G., & Christiaens, O. (2019). Potential of RNA interference in the study and management of the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 100(2), e21522.

- Guan, R. B., Li, H. C., Fan, Y. J., Hu, S. R., Christiaens, O., Smagghe, G., & Miao, X. X. (2018). A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 6011-6021.
- Guo, W. C., Fu, K. Y., Yang, S., Li, X. X., & Li, G. Q. (2015). Instar-dependent systemic RNA interference response in *Leptinotarsa decemlineata* larvae. *Pesticide biochemistry and physiology*, 123, 64-73.
- Haasnoot, J., Westerhout, E. M., & Berkhout, B. (2007). RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nature Biotechnology*, 25, 1435-1443.
- Hammock, B. D., & Sparks, T. C. (1977). A rapid assay for insect juvenile hormone esterase activity. *Analytical Biochemistry*, 82, 573-579.
- Harrison, J. F. (2001). Insect acid-base physiology. *Annual Review of Entomology*, 46, 221.
- Hogenkamp, D. G., Arakane, Y., Zimoch, L., Merzendorfer, H., Kramer, K. J., Beeman, R. W., ... & Muthukrishnan, S. (2005). Chitin synthase genes in *Manduca sexta*: characterization of a gut-specific transcript and differential tissue expression of alternately spliced mRNAs during development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 529-540.
- Israni, B., & Rajam, M. V. (2017). Silencing of ecdysone receptor, insect intestinal mucin and sericotropin genes by bacterially produced double-stranded RNA affects larval growth and development in *Plutella xylostella* and *Helicoverpa armigera*. *Insect Molecular Biology*, 26, 164-180.
- Israni, B., & Rajam, M. V. (2017). Silencing of ecdysone receptor, insect intestinal mucin and sericotropin genes by bacterially produced double-stranded RNA affects larval growth and development in *Plutella xylostella* and *Helicoverpa armigera*. *Insect Molecular Biology*, 26, 164-180.
- Jeong, H., Barbe, V., Lee, C. H., Vallenet, D., Yu, D. S., Choi, S. H., ... & Kim, J. F. (2009). Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21 (DE3). *Journal of Molecular Biology*, 394, 644-652.
- Jiang, L. H., Mu, L. L., Jin, L., Anjum, A. A., & Li, G. Q. (2021). RNAi for chitin synthase 1 rather than 2 causes growth delay and molting defect in *Henosepilachna vigintioctopunctata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 178, 104934.
- Kamita, S. G., Hinton, A. C., Wheelock, C. E., Wogulis, M. D., Wilson, D. K., Wolf, N. M., ... & Hammock, B. D. (2003). Juvenile hormone (JH) esterase: why are you so JH specific?. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33, 1261-1273.
- Kato, N., Mueller, C. R., Fuchs, J. F., Wessely, V., Lan, Q., & Christensen, B. M. (2006). Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 1-9.
- Keiser, K. C., Brandt, K. S., Silver, G. M., & Wisnewski, N. (2002). Cloning, partial purification and in vivo developmental profile of expression of the juvenile hormone epoxide hydrolase of *Ctenocephalides felis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 50, 191-206.
- Kelkenberg, M., Odman-Naresh, J., Muthukrishnan, S., & Merzendorfer, H. (2015). Chitin is a necessary component to maintain the barrier function of the peritrophic matrix in the insect midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 56, 21-28.
- Klowden, M. J. (2007). Endocrine systems. In: Klowden, MJ., editor. *Physiological systems in insects.*, 2nd ed 1-49.
- Kolliopoulou, A., & Swevers, L. (2014). Recent progress in RNAi research in Lepidoptera: Intracellular machinery, antiviral immune response and prospects for insect pest control. *Current Opinion in Insect Science*, 6, 28-34.

- Lamontagne, B., Larose, S., Boulanger, J., & Elela, S. A. (2001). The RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. *Yeast*, 45, 154-158.
- Li, S., Falabella, P., Kuriachan, I., Vinson, S. B., Borst, D. W., Malva, C., & Pennacchio, F. (2003). Juvenile hormone synthesis, metabolism, and resulting haemolymph titre in *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Toxoneuron nigriceps*. *Journal of Insect Physiology*, 49, 1021-1030.
- Li, S., Jiang, R., Cao, M. (2004). Metabolism of juvenile hormone. *Acta Entomologica Sinica*, 47, 389-393.
- Liu, J., Smagghe, G., & Swevers, L. (2013). Transcriptional response of BmToll9-1 and RNAi machinery genes to exogenous dsRNA in the midgut of *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 59, 646-654.
- Liu, X., Zhang, J., & Zhu, K. Y. (2019). Chitin in arthropods: Biosynthesis, modification, and metabolism. *Targeting Chitin-Containing Organisms*, 169-207.
- Lü, F. G., Fu, K. Y., Guo, W. C., & Li, G. Q. (2015). Characterization of two juvenile hormone epoxide hydrolases by RNA interference in the Colorado potato beetle. *Gene*, 570, 264-271.
- Lu, Z. J., Huang, Y. L., Yu, H. Z., Li, N. Y., Xie, Y. X., Zhang, Q., ... & Su, H. N. (2019). Silencing of the chitin synthase gene is lethal to the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 3734.
- Maxwell, R. A., Welch, W. H., Horodyski, F. M., Schegg, K. M., & Schooley, D. A. (2002). Juvenile hormone diol kinase: II. Sequencing, cloning, and molecular modeling of juvenile hormone-selective diol kinase from *Manduca sexta*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 21882-21890.
- Merzendorfer, H. (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *European Journal of Cell Biology*, 90, 759-769.
- Moussian, B. (2013). The apical plasma membrane of chitin-synthesizing epithelia. *Insect Science*, 20, 139-146.
- Nie, Z., Zhou, F., Li, D., Lv, Z., Chen, J., Liu, Y., ... & Zhang, Y. (2013). RIP-seq of BmAgo2-associated small RNAs reveal various types of small non-coding RNAs in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 14, 1-15.
- Niwa, Y. S., & Niwa, R. (2016). Transcriptional regulation of insect steroid hormone biosynthesis and its role in controlling timing of molting and metamorphosis. *Development, Growth & Differentiation*, 58, 94-105.
- Noh, M. Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., & Arakane, Y. (2016). Cuticle formation and pigmentation in beetles. *Current Opinion in Insect Science*, 17, 1-9.
- Obbard, D. J., Gordon, K. H., Buck, A. H., & Jiggins, F. M. (2009). The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 99-115.
- Obbard, D. J., Jiggins, F. M., Halligan, D. L., & Little, T. J. (2006). Natural selection drives extremely rapid evolution in antiviral RNAi genes. *Current Biology*, 16, 580-585.
- Ono, H., Rewitz, K. F., Shinoda, T., Itoyama, K., Petryk, A., Rybczynski, R., ... & O'Connor, M. B. (2006). Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Developmental Biology*, 298, 555-570.
- Ostrowski, S., Dierick, H. A., & Bejsovec, A. (2002). Genetic control of cuticle formation during embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 161, 171-182.
- Palaka, B. K., Velmurugan Ilavarasi, A., Sapam, T. D., Kotapati, K. V., Nallala, V. S., Khan, M. B., & Ampasala, D. R. (2019). Molecular cloning, gene expression analysis, and in silico characterization of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase from *Bombyx mori*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66, 880-899.

- Paulillo, L. C. M. S., Magno Sebbenn, A., de Carvalho Derbyshire, M. T. V., Góes-Neto, A., de Paula Brotto, M. A., & Figueira, A. (2012). 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*, 81, 34-52.
- Peng, Y., Wang, K., Fu, W., Sheng, C., & Han, Z. (2018). Biochemical comparison of dsRNA degrading nucleases in four different insects. *Frontiers in Physiology*, 9, 624.
- Peng, Y., Wang, K., Zhu, G., Han, Q., Chen, J., Elzaki, M. E. A., ... & Han, Z. (2020). Identification and characterization of multiple dsRNases from a lepidopteran insect, the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 162, 86-95.
- Pereira, A. E., Carneiro, N. P., & Siegfried, B. D. (2016). Comparative susceptibility of southern and western corn rootworm adults and larvae to vATPase-A and Snf7 dsRNAs. *Journal of RNAi Gene Silencing*, 12, 528-535.
- Petryk, A., Warren, J. T., Marqués, G., Jarcho, M. P., Gilbert, L. I., Kahler, J., ... & O'Connor, M. B. (2003). Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 13773-13778.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2016.
- Rana, S., Rajurkar, A. B., Kumar, K. K., & Mohankumar, S. (2020). Comparative analysis of Chitin SynthaseA dsRNA mediated RNA interference for management of crop pests of different families of Lepidoptera. *Frontiers in Plant Science*, 11, 427.
- Rencher, A. C., & Schaalje, G. B. (2008). *Linear models in statistics*. John Wiley & Sons.
- Rewitz, K. F., O'Connor, M. B., & Gilbert, L. I. (2007). Molecular evolution of the insect Halloween family of cytochrome P450s: phylogeny, gene organization and functional conservation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 741-753.
- Riddiford, L. M. (1994). Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 24, pp. 213-274). Academic Press.
- Saleh, M. C., van Rij, R. P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P. H., & Andino, R. (2006). The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature Cell Biology*, 8, 793-802.
- Saxena, S., Reddy, K. R. K., & Rajam, M. V. (2022). dsRNA-mediated silencing of chitin synthase A (CHSA) affects growth and development of *Leucinodes orbonalis*, brinjal fruit and shoot borer. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 25, 101908.
- Schumann, I., Kenny, N., Hui, J., Hering, L., & Mayer, G. (2018). Halloween genes in panarthropods and the evolution of the early moulting pathway in *Ecdysozoa*. *Royal Society Open Science*, 5, 180888.
- Seino, A., Ogura, T., Tsubota, T., Shimomura, M., Nakakura, T., Tan, A., ... & Shiotsuki, T. (2010). Characterization of juvenile hormone epoxide hydrolase and related genes in the larval development of the silkworm *Bombyx mori*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 1421-1429.
- Share, M. R., & Roe, R. M. (1988). A partition assay for the simultaneous determination of insect juvenile hormone esterase and epoxide hydrolase activity. *Analytical Biochemistry*, 169, 81-88.
- Shi, J. F., Fu, J., Mu, L. L., Guo, W. C., & Li, G. Q. (2016a). Two *Leptinotarsa* uridine diphosphate N-acetylglucosamine pyrophosphorylases are specialized for chitin synthesis in larval epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 68, 1-12.

- Shi, J. F., Mu, L. L., Chen, X., Guo, W. C., & Li, G. Q. (2016b). RNA interference of chitin synthase genes inhibits chitin biosynthesis and affects larval performance in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *International Journal of Biological Sciences*, 12, 1319.
- Shukla, J. N., Kalsi, M., Sethi, A., Narva, K. E., Fishilevich, E., Singh, S., ... & Palli, S. R. (2016). Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. *RNA Biology*, 13, 656-669.
- Singh, I. K., Singh, S., Mogilicherla, K., Shukla, J. N., & Palli, S. R. (2017). Comparative analysis of double-stranded RNA degradation and processing in insects. *Scientific Reports*, 7, 1-12.
- Song, H., Fan, Y., Zhang, J., Cooper, A. M., Silver, K., Li, D., ... & Zhang, J. (2019). Contributions of dsRNases to differential RNAi efficiencies between the injection and oral delivery of dsRNA in *Locusta migratoria*. *Pest Management Science*, 75, 1707-1717.
- Song, H., Zhang, J., Li, D., Cooper, A. M., Silver, K., Li, T., ... & Zhang, J. (2017). A double-stranded RNA degrading enzyme reduces the efficiency of oral RNA interference in migratory locust. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 86, 68-80.
- Sumiya, E., Ogino, Y., Toyota, K., Miyakawa, H., Miyagawa, S., & Iguchi, T. (2016). Neverland regulates embryonic moltings through the regulation of ecdysteroid synthesis in the water flea *Daphnia magna*, and may thus act as a target for chemical disruption of molting. *Journal of Applied Toxicology*, 36, 1476-1485.
- Swevers, L., Liu, J., Huvenne, H., & Smagghe, G. (2011). Search for limiting factors in the RNAi pathway in silkworm tissues and the Bm5 cell line: the RNA-binding proteins R2D2 and Translin. *PloS One*, 6, e20250.
- Swevers, L., Vanden Broeck, J., & Smagghe, G. (2013). The possible impact of persistent virus infection on the function of the RNAi machinery in insects: a hypothesis. *Frontiers in Physiology*, 4, 319.
- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J. S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., ... & Bebas, P. (2011). RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 57, 231-245.
- Terra, W. R. (1990). Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology*, 35, 181-200.
- Tian, H., Peng, H., Yao, Q., Chen, H., Xie, Q., Tang, B., & Zhang, W. (2009). Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS One*, 4, e6225.
- Timmons, L., Court, D. L., & Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263, 103-112.
- Tusun, A., Li, M., Liang, X., Yang, T., Yang, B., & Wang, G. (2017). Juvenile hormone epoxide hydrolase: A promising target for hemipteran pest management. *Scientific Reports*, 7, 1-10.
- Vatanparast, M., & Kim, Y. (2017). Optimization of recombinant bacteria expressing dsRNA to enhance insecticidal activity against a lepidopteran insect, *Spodoptera exigua*. *PLoS One*, 12, e0183054.
- Vatanparast, M., Kazzazi, M., Sajjadian, S. M., & Park, Y. (2021). Knockdown of *Helicoverpa armigera* protease genes affects its growth and mortality via RNA interference. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 108, e21840.
- Vogel, E., Santos, D., Mingels, L., Verdonckt, T. W., & Broeck, J. V. (2019). RNA interference in insects: protecting beneficials and controlling pests. *Frontiers in Physiology*, 9, 1912.

- Wan, P. J., Jia, S., Li, N., Fan, J. M., & Li, G. Q. (2014a). RNA interference depletion of the Halloween gene disembodied implies its potential application for management of planthopper *Sogatella furcifera* and *Laodelphax striatellus*. *PLoS One*, 9, e86675.
- Wan, P. J., Jia, S., Li, N., Fan, J. M., & Li, G. Q. (2014b). The putative Halloween gene phantom involved in ecdysteroidogenesis in the white-backed planthopper *Sogatella furcifera*. *Gene*, 548, 112-118.
- Wan, P. J., Jia, S., Li, N., Fan, J. M., & Li, G. Q. (2015). A Halloween gene shadow is a potential target for RNA-interference-based pest management in the small brown planthopper *Laodelphax striatellus*. *Pest Management Science*, 71, 199-206.
- Wang, K., Peng, Y., Pu, J., Fu, W., Wang, J., & Han, Z. (2016). Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation in vivo. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 77, 1-9.
- Wang, X. F., Chen, Z., Wang, X. B., Xu, J., Chen, P., & Ye, H. (2021). Bacterial-mediated RNAi and functional analysis of Natalisin in a moth. *Scientific Reports*, 11, 1-12.
- Wang, Y. R., Wang, Y. Z., Wang, W. Z., Wang, R., & Gao, S. J. (2018). RNA interference of tubulin genes has lethal effects in *Mythimna separate*. *Gene*, 670, 1-6.
- Wen, R., Wang, B., Wang, B., & Ma, L. (2018). Characterization and Expression Profiles of Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase From *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantridae) and RNA Interference by Ingestion. *Journal of Insect Science*, 18, 13.
- Whangbo, J. S., & Hunter, C. P. (2008). Environmental RNA interference. *Trends in Genetics*, 24, 297-305.
- Whitten, M. M., Facey, P. D., Del Sol, R., Fernández-Martínez, L. T., Evans, M. C., Mitchell, J. J., ... & Dyson, P. J. (2016). Symbiont-mediated RNA interference in insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283, 20160042.
- Wu, J. J., Chen, Z. C., Wang, Y. W., Fu, K. Y., Guo, W. C., & Li, G. Q. (2019a). Silencing chitin deacetylase 2 impairs larval-pupal and pupal-adult molts in *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Molecular Biology*, 28, 52-64.
- Wu, J. J., Mu, L. L., Chen, Z. C., Fu, K. Y., Guo, W. C., Li, C., & Li, G. Q. (2019b). Disruption of ecdysis in *Leptinotarsa decemlineata* by knockdown of chitin deacetylase 1. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22, 443-452.
- Wyatt, G. R., & Davey, K. G. (1996). Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormone in adult insects. *Advances in Insect Physiology*, 26, 1-155.
- Wynant, N., Santos, D., & Broeck, J. V. (2014). Biological mechanisms determining the success of RNA interference in insects. *International review of cell and molecular biology*, 312, 139-167.
- Wynant, N., Santos, D., Van Wielendaele, P., & Vanden Broeck, J. (2014). Scavenger receptor-mediated endocytosis facilitates RNA interference in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Molecular Biology*, 23, 320-329.
- Xia, Q., Li, S., & Feng, Q. (2014). Advances in silkworm studies accelerated by the genome sequencing of *Bombyx mori*. *Annual Review of Entomology*, 59, 513-536.
- Xiao, D., Gao, X., Xu, J., Liang, X., Li, Q., Yao, J., & Zhu, K. Y. (2015). Clathrin-dependent endocytosis plays a predominant role in cellular uptake of double-stranded RNA in the red flour beetle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 60, 68-77.
- Xu, J., Wang, X. F., Chen, P., Liu, F. T., Zheng, S. C., Ye, H., & Mo, M. H. (2016). RNA interference in moths: mechanisms, applications, and progress. *Genes*, 7, 88.
- Yang, J., & Han, Z. J. (2014). Efficiency of different methods for dsRNA delivery in cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Journal of Integrative Agriculture*, 13, 115-123.
- Yoon, J. S., Gurusamy, D., & Palli, S. R. (2017). Accumulation of dsRNA in endosomes contributes to inefficient RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 90, 53-60.

- Yoon, J. S., Mogilicherla, K., Gurusamy, D., Chen, X., Chereddy, S. C., & Palli, S. R. (2018). Double-stranded RNA binding protein, Staufen, is required for the initiation of RNAi in coleopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, 8334-8339.
- Yoshiyama, T., Namiki, T., Mita, K., Kataoka, H., & Niwa, R. (2006). Neverland is an evolutionally conserved Rieske-domain protein that is essential for ecdysone synthesis and insect growth. *Development*, 133, 2565–2574.
- Zhang, J., Khan, S. A., Hasse, C., Ruf, S., Heckel, D. G., & Bock, R. (2015). Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science*, 347, 991-994.
- Zhang, X., Liu, X., Ma, J., & Zhao, J. (2013). Silencing of cytochrome P450 CYP6B6 gene of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) by RNAi. *Bulletin of Entomological Research*, 103, 584-591.
- Zhu, K. Y., & Palli, S. R. (2020). Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference. *Annual Review of Entomology*, 65, 293-311.
- Zimoch, L., Hogenkamp, D. G., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S., & Merzendorfer, H. (2005). Regulation of chitin synthesis in the larval midgut of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 515-527.

4. IDENTIFICAÇÃO DO GENE *UP56* DE *Diatraea saccharalis* QUE CODIFICA UMA NUCLEASE RELACIONADA À INSENSIBILIDADE À RNAI

Resumo

O RNAi é considerado uma tecnologia com potencial para o controle de pragas agrícolas. Mais de 70% de todas as pragas agrícolas pertencem a ordem Lepidoptera, que, ao contrário de outras ordens, não são muito sensíveis ao silenciamento gênico induzido por RNAi. Um importante fator limitante do silenciamento gênico mediado por RNAi é a degradação do dsRNA entregue por nucleases presentes em tecidos ou órgãos dos insetos antes da absorção celular. No presente estudo, por meio da análise do transcriptoma de *D. saccharalis*, identificamos um gene nomeado *Ds_up56* que é constantemente expresso ao longo do desenvolvimento do inseto (ovo – 6º instar larval), e que é regulado positivamente em resposta a exposição a moléculas de dsRNA. Sua identidade foi validada e a análise de sequência indicou que *Ds_up56* codifica a proteína REase, caracterizada por conter um domínio PIN, que atua na degradação de dsRNA, similar ao encontrado em outras espécies de lepidópteros. O fornecimento simultâneo de *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA contra o gene alvo do inseto quitina sintase - *CHI* (ds*CHI*), e dsRNA contra *Ds_up56* (ds*Ds_up56*) às lagartas de *D. saccharalis* resultou em uma redução significativa na expressão do gene da REase e, principalmente, do gene-alvo *CHI*. O knockdown do *Ds_up56* reduziu em 3,5 vezes o acúmulo de transcritos de *CHI* demonstrando a contribuição deste gene para a degradação de transcritos do gene alvo e aumentando a eficiência RNAi. Logo, os resultados indicam que a presença e ação de uma REase pode justificar a recalcitrância de *D. saccharalis* ao RNAi, e que esse mecanismo parece ser comum a outras espécies de lepidópteros. A identificação deste gene pode vir a facilitar a adoção de RNAi como estratégia de controle de pragas de lepidópteros, particularmente na abordagem ‘RNAi-of-RNAi’.

Palavras-chave: Alimentação oral; Eficiência RNAi; RNA dupla-fita; “RNAi-of-RNAi”.

Abstract

RNAi is considered a promising technology for agricultural pest control. More than 70% of all agricultural pests belong to the order Lepidoptera, which, unlike other orders, are not very sensitive to RNAi-induced gene silencing. A significant limiting factor of RNAi-mediated gene silencing is the degradation of dsRNA by nucleases present in insect tissues and organs before cellular uptake. In the present study, through the analysis of the *D. saccharalis* transcriptome, we identified a gene named *Ds_up56*, constantly expressed throughout the development of the insect (egg - 6th instar larval), and that is up-regulated in response to exposure to molecules of dsRNA. Its identity was validated, and sequence analysis indicated that *Ds_up56* encodes the REase protein, characterized by containing a PIN domain, which acts on dsRNA degradation, similarly to that found in other lepidopteran species. Simultaneous delivery of *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressing dsRNA against the chitin synthase insect target gene - *CHI* (ds*CHI*) and dsRNA against *Ds_up56* (ds*Ds_up56*) to *D. saccharalis* larvae resulted in a significant reduction in REase gene expression and, mainly, the *CHI* target gene. The knockdown of *Ds_up56* reduced the accumulation of *CHI* transcripts by 3.5 times, demonstrating the contribution of this gene to the degradation of transcripts of the target gene and increasing RNAi efficiency. Therefore, the results indicate that the presence and action of a REase may justify the recalcitrance of *D. saccharalis* to RNAi and that this mechanism seems familiar to other lepidopteran species.

Identifying this gene may facilitate the adoption of RNAi as a strategy to control lepidopteran pests.

Keywords: Double-strand RNA; Oral feeding; RNAi efficiency; RNAi-of-RNAi.

4.1. Introdução

O mecanismo de RNAi pode ser usado como uma ferramenta importante para estudos de função gênica, bem como um potencial meio de manejo de pragas na agricultura (Joga *et al.*, 2016; Zhu & Palli, 2020; Zhang *et al.*, 2015). Basicamente, moléculas de RNA dupla-fita (dsRNA) são fornecidas ao inseto, as quais são subsequentemente absorvidas pelas células do tecido alvo e, em seguida, processadas pelo maquinaria principal de RNAi, levando à formação de pequenos RNAs interferentes (siRNAs) (Gammon *et al.*, 2015). Após o acoplamento com o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), os siRNAs guiam o complexo para o mRNA complementar específico, que é então clivado de maneira dependente de similaridade de sequência (Gammon *et al.*, 2015). Devido à especificidade e por se tratar de ingrediente ativo biodegradável (RNA), a abordagem de RNAi tem sido ativamente promovida no desenvolvimento de biopesticidas ambientalmente amigáveis (Christiaens *et al.*, 2020; Dubelman *et al.*, 2014).

Para uma estratégia de controle de pragas bem-sucedida, a entrega de dsRNA por via oral é o método mais conveniente. No entanto, as respostas de RNAi a ingestão do dsRNA administrado são altamente variáveis entre as ordens e espécies de insetos (Cooper *et al.*, 2019; Yen *et al.*, 2020; Silver *et al.*, 2021; Christiaens *et al.*, 2020; Cagliari *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016). Os coleópteros são geralmente considerados altamente sensíveis; por outro lado, outras ordens de insetos, como dípteros, hemípteros e, principalmente lepidópteros, mostram uma resposta mais variável ou baixa ao dsRNA administrado por ingestão (Baum *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2016; Castellanos *et al.*, 2019; Terenius *et al.*, 2011; Yoon *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2011).

Muitos fatores ou mecanismos fisiológicos dos insetos que influenciam a eficiência do RNAi têm sido propostos, tais como aprisionamento endossômico, mau funcionamento da maquinaria central de RNAi, disseminação sistêmica restrita e a presença de dsRNA nucleases (dsRNase) em fluidos corporais de insetos, entre outros (Zhu *et al.*, 2020; Cooper *et al.*, 2019; Christiaens *et al.*, 2020). A ação de dsRNases é apontada como um dos principais fatores responsáveis pela eficiência limitada do RNAi devido às suas atividades na degradação do dsRNA (Fan *et al.*, 2021; Gurusamy *et al.*, 2021; Peng *et al.*, 2021).

Estudos anteriores demonstraram que a atividade da ribonuclease de RNA fita dupla (dsRNase) no canal digestivo desempenha um papel crucial na limitação da resposta oral de RNAi em várias ordens de insetos (Wang *et al.*, 2016; Castellanos *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2012; Prentice *et al.*, 2019; Taning *et al.*, 2016). A atividade de dsRNase foi notavelmente demonstrada no sistema digestivo de insetos, embora os genes sejam expressos em vários tecidos e fluidos dos insetos (Singh *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2012; Christiaens *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2020a; Peng *et al.*, 2020b); genes de dsRNase foram identificados e caracterizados em várias espécies de insetos (Peng *et al.*, 2020a; Peng *et al.*, 2020b; Prentice *et al.*, 2019; Tayler *et al.*, 2019; Wynant *et al.*, 2014).

Uma dsRNase foi identificada pela primeira vez em insetos no fluido do intestino médio do bicho da seda (*Bombyx mori*), e contém um peptídeo sinal e um domínio de endonuclease não específico (NUC) (Arimatsu *et al.*, 2007). Experimentos *ex vivo* mostraram que a atividade da dsRNase varia de acordo com a ordem dos insetos. Em coleópteros, os genes *dsRNase* são expressos principalmente no intestino (Prentice *et al.*, 2019; Powell *et al.*, 2017; Guan *et al.*, 2018), enquanto em hemípteros, as dsRNases são mais expressas na saliva, mas não no intestino ou na hemolinfa (Lomate *et al.*, 2016; Allen *et al.*, 2012). Em comparação, a degradação do dsRNA ocorre muito mais rapidamente em hemolinfa ou intestino de lepidópteros do que ocorre em membros de outras ordens, como no caso da dsRNase de *Heliothis virescens* e *Spodoptera frugiperda* (Baum *et al.*, 2014; Gurusamy *et al.*, 2021; Mogilicherla *et al.*, 2018; Shukla *et al.*, 2016).

A eliminação da expressão de dsRNase melhora muito a eficácia do RNAi em vários insetos, incluindo *Bactrocera tryoni* (Diptera), *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera) e *Nezara viridula* (Hemiptera) e *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera) (Tayler *et al.*, 2019; Spit *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2021; Guan *et al.*, 2019). O silenciamento de dsRNases por RNAi, seguido por um tratamento com RNAi direcionado a um gene-alvo essencial do inseto é uma estratégia chamada de “RNAi-on-RNAi” ou ainda co-silenciamento (Fan *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). Essa abordagem levou a uma eficácia de RNAi significativamente aprimorada para genes essenciais em coleópteros [*Tribolium castaneum* (Peng *et al.*, 2020a), *Cylas puncticollis* (Prentice *et al.*, 2019), *Leptinotarsa decemlineata* (Spit *et al.*, 2017) e *Anthonomus grandis* (Garcia *et al.*, 2017)], ortópteros [*Locusta migratoria* (Song *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2018) e *Schistocerca gregaria* (Wynant *et al.*, 2014)] e dípteros [*Bactrocera tryoni* (Tayler *et al.*, 2019) e *Drosophila suzukii* (Yoon *et al.*, 2021)]. Resultados semelhantes também foram observados em pragas sugadoras como o hemíptero *Bemisia tabaci* (Luo *et al.*, 2017), e mastigadores, como os lepidópteros *Ostrinia furnacalis* (Guan *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2021),

O. nubilalis (Cooper *et al.*, 2020), *Spodoptera litura* (Peng *et al.*, 2020b), *Plutella xylostella* (Chen *et al.*, 2021), *Spodoptera frugiperda* (Yao *et al.*, 2022) e *Cnaphalocrocis medinalis* (Li *et al.*, 2022).

Analisando o transcriptoma da broca asiática do milho *O. furnacalis*, Lepidoptera, foi identificado um gene denominado *up56*, induzido em resposta a exposição a moléculas de dsRNA (Guan *et al.*, 2018). Este gene parece ser específico desta ordem de insetos e codifica uma proteína nuclease denominada REase, com domínio característico PIN, que está diretamente relacionada à insensibilidade ao RNAi (Guan *et al.*, 2018). Descobriu-se ainda que a regulação positiva do gene *up56* é mais rápida do que a do gene que codifica a enzima Dicer, associada ao mecanismo de RNAi, impedindo, portanto, que ocorra o desencadeamento do silenciamento gênico quando o inseto é exposto a moléculas de dsRNA exógena (Guan *et al.*, 2018).

Portanto, nossa hipótese neste estudo foi verificar a existência de gene expresso relacionado à ribonucleases de degradação de dsRNA em *Diatraea saccharalis* buscando demonstrar a influência deste gene nas respostas de silenciamento gênico nesta espécie e, conseqüentemente, explicar a ausência de resposta RNAi, ou ainda, sua recalitrância aos mecanismos de RNA interferente.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Identificação, amplificação e clonagem do gene *up56* de *D. saccharalis*

Primeiramente, utilizando como referência a sequência do gene *up56*, que codifica a proteína REase de *O. furnacalis* (Guan *et al.*, 2018), realizamos uma busca por transcritos de *D. saccharalis* com similaridade ($E\text{-value} < e^{-30}$) no banco de dados de RNA-seq disponível no laboratório. A partir da sequência encontrada, *primers* específicos foram desenhados por meio do *Primer designing tool* (NCBI) para amplificação da provável sequência gênica *up56* de *D. saccharalis*. Esta reação de amplificação foi realizada contendo cerca de 100 ng do mix de cDNA de lagartas de todos os instares do inseto, 2,5 mM de MgCl₂, 100 μM de dNTP, 0,1 μM de cada *primer* (ACAGTCGAATTTGCCATCCG; GTTGCCAGTTTTTGCGGAGT; tamanho esperado do amplicon: 1440 pb) e 2 U de *Taq* polimerase em tampão de (NH₄)₂SO₄ em volume final de 25 μL. As condições do termociclador foram 95°C por 2 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 62°C por 30 s, 72°C por 2 min, com 72°C por 5 min de extensão final. A reação foi submetida à eletroforese em gel de 1% agarose em tampão TAE e o fragmento de interesse foi extraído do gel e purificado com o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen; Hilden, Alemanha) de acordo com as orientações do fabricante.

Em seguida, o fragmento purificado foi clonado em vetor pGEM-T *Easy*. Para isso, cerca de 55 ng de DNA amplificado, purificado e quantificado em *DyNA Quant 200 fluorometer* (Hoefer; Holliston, MA, EUA) foi aliqotado em microtubo juntamente com tampão de ligação, 50 ng de vetor pGEM-T *Easy* e 5 U de T4 DNA ligase (Promega Madison, WI, EUA) e incubados a 4°C por 16 h em reações de 10 µL. Em seguida, 2 µL da reação foram utilizados para a transformação de *E. coli* eletrocompetente, cepa TOP10, empregando *MicroPulser Eletroporator Apparatus* (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio contendo 100 mg L⁻¹ de ampicilina, 40 µg mL⁻¹ de X-Gal e 0,1 mM de IPTG para seleção das bactérias transformantes. Bactérias positivas para a transformação foram inoculadas em meio LB líquido contendo 100 mg mL⁻¹ de ampicilina e a presença do inserto foi confirmada pela extração do DNA plasmidial por lise alcalina. Para confirmar a identidade do gene de interesse, os plasmídeos foram sequenciados empregando o kit *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (GE Health Sciences, Champaign, IL, EUA), em um sequenciador *3500 Genetic Analyser* (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA). As reações de sequenciamento continham *primers* T7 ou SP6, e foram conduzidas sob as seguintes condições de reação: 35 ciclos de 95°C por 15 s, 50°C por 15 s e 60°C por 2 min.

4.2.2. Análise filogenética do gene *up56* de *D. saccharalis*

Para a classificação do gene *up56* de *D. saccharalis*, foi conduzida uma análise filogenética empregando 35 sequências, as mesmas usadas por Guan *et al.* (2018). Estas sequências correspondem a sequências de proteínas de seis ordens de insetos, retiradas de uma análise no algoritmo tBLASTN (NCBI), tendo a sequência proteica REase de *O. furnacalis* como consulta. As informações das sequências utilizadas encontram-se listadas na Tabela 1. As 36 sequências selecionadas foram alinhadas com o *software* MUSCLE. A análise filogenética foi realizada utilizando-se o MEGA v7.0.26. Uma árvore foi construída utilizando o método da vizinhança (*neighbor-joining*) e modelo de Poisson, e testada pelo método *bootstrap* com 1000 repetições. Todas as lacunas foram tratadas como dados ausentes.

Tabela 6. Apresentação das informações das sequências utilizadas para análise filogenética da proteína REase de *Diatrea saccharalis*.

Ordem	Espécie	Abreviação	Número de Acesso NCBI
Hemiptera	<i>Cimex lectularius</i>	<i>C. lect</i>	XP_014247031
Hemiptera	<i>Halyomorpha halys</i>	<i>H. haly</i>	XP_014288558
Hemiptera	<i>Lygus hesperus</i>	<i>L. hesp</i>	JAG17258
Lepidoptera	<i>Diatrea saccharalis</i>	<i>D. sacc (REase)</i>	Transcriptoma
Lepidoptera	<i>Ostrinia furnacalis</i>	<i>O. furn (REase)</i>	AYE20402.1
Lepidoptera	<i>Plutella xylostella</i>	<i>P. xylo</i>	XP_011561188
Lepidoptera	<i>Amyelois transitella</i>	<i>A. tran</i>	XP_013200440
Lepidoptera	<i>Papilio machaon</i>	<i>P. mach</i>	XP_014362681
Lepidoptera	<i>Operophtera brumata</i>	<i>O. brum</i>	KOB69736
Lepidoptera	<i>Danaus plexippus</i>	<i>D. plex</i>	EHJ71028
Lepidoptera	<i>Papilio polytes</i>	<i>P. poly</i>	XP_013133498
Lepidoptera	<i>Papilio xuthus</i>	<i>P. xuth</i>	KPI98544
Lepidoptera	<i>Amyelois transitella</i>	<i>A. tran U</i>	XP_013194003
Lepidoptera	<i>Plutella xylostella</i>	<i>P. xylo U</i>	XP_011563092
Lepidoptera	<i>Papilio polytes</i>	<i>P. poly U</i>	XP_013145880
Lepidoptera	<i>Pectinophora gossypiella</i>	<i>P. goss U</i>	JAT88369.1
Hymenoptera	<i>Acromyrmex echinatior</i>	<i>A. echi</i>	XP_011054879
Hymenoptera	<i>Apis florea</i>	<i>A. flor</i>	XP_012349417
Hymenoptera	<i>Athalia rosae</i>	<i>A. rosa</i>	XP_012251909
Hymenoptera	<i>Apis dorsata</i>	<i>A. dors</i>	XP_006608426
Hymenoptera	<i>Ceratosolen solmsi marchali</i>	<i>C. solm</i>	XP_011501256
Hymenoptera	<i>Copidosoma floridanum</i>	<i>C. flor</i>	XP_014215245
Hymenoptera	<i>Fopius arisanus</i>	<i>F. aris</i>	XP_011298247
Hymenoptera	<i>Harpegnathos saltator</i>	<i>H. salt</i>	EFN83934
Hymenoptera	<i>Monomorium pharaonis</i>	<i>M. phar</i>	XP_012539364
Hymenoptera	<i>Nasonia vitripennis</i>	<i>N. vitr</i>	XP_003425709
Hymenoptera	<i>Solenopsis invicta</i>	<i>S. i nvi</i>	XP_011167357
Hymenoptera	<i>Trichogramma pretiosum</i>	<i>T. pret</i>	XP_014223965
Hymenoptera	<i>Wasmannia auropunctata</i>	<i>W. auro</i>	XP_011701331
Coleoptera	<i>Tribolium castaneum</i>	<i>T. cast</i>	XP_975212
Diptera	<i>Bactrocera dorsalis</i>	<i>B. dors</i>	XP_011207058
Diptera	<i>Ceratitis capitata</i>	<i>C. capi</i>	XP_012155436
Diptera	<i>Musca domestica</i>	<i>M. domes</i>	XP_005175977
Diptera	<i>Stomoxys calcitrans</i>	<i>S. calc</i>	XP_013098039
Diptera	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>D. mela</i>	NP_523451
Isoptera	<i>Zootermopsis nevadensis</i>	<i>Z. neva</i>	KDR10993

Além da identificação baseada em análise comparativa com a sequência do gene *up_56* de *O. furnacalis* (Guan *et al.*, 2018) e análise filogenética, buscamos realizar um tBLASTx utilizando esta mesma sequência referência (*up_56* de *O. furnacalis*) contra o transcriptoma de *D. saccharalis* para identificar os transcritos da espécie mais similares à sequência referência e, confirmar que o transcrito identificado como da REase estava correto.

4.2.3. Fornecimento de dsGFP para lagartas de *D. saccharalis* a fim de verificar a regulação da expressão de *Ds_up56*

O plasmídeo pL4440: *GFP* (Addgene) foi utilizado para a transformação das bactérias *E. coli* HT115 (DE3). Desta maneira, 2 μL do plasmídeo pL4440: *GFP* foi adicionado à 45 μL de cultura eletrocompetente da cepa bacteriana e eletroporado (*Gene Pulser*, BioRad, -2,5kV, 25 μF , 200 Ω , cubetas de 0,2 cm). As células eletroporadas foram plaqueadas e incubadas por 16 h a 37°C em meio sólido LB adicionado de antibiótico de seleção específico da bactéria e vetor (tetraciclina 12,5 mg mL⁻¹ e ampicilina 100 mg mL⁻¹, respectivamente). Os clones foram repicados em meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos a 37°C por 18 h sob agitação. Após este período, as bactérias transformadas foram estocadas a -80°C.

Colônias individuais de bactérias HT115 (DE3) contendo a construção pL4440: *GFP* foram cultivadas durante 14 h em meio LB com 100 mg mL⁻¹ de ampicilina e 12,5 mg mL⁻¹ de tetraciclina a 37°C sob agitação (120 rpm). Após este período, a cultura foi diluída 100 vezes em meio 2xYT (composto de 16 g de triptona, 10 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl por litro, pH 7,0) e mantida em condições ótimas de crescimento (agitação de 130 rpm a 37°C) até atingir O.D._{600nm} = 0,4 (Timmons *et al.*, 2001). Quando este valor de OD_{600nm} foi atingido, uma amostra de 1,8 mL da suspensão de bactérias foi retirada. Então, a síntese da RNA Polimerase T7 foi induzida pela adição IPTG à concentração final de 0,4 mM e as bactérias foram mantidas por mais 4 h a 37°C sob agitação a 120 rpm. A suspensão bacteriana foi então centrifugada a 10.000 g por 2 min e o *pellet* ressuspendido em água milliQ autoclavada para atingir a concentração de 250x. No momento anterior à centrifugação, também foi retirada mais uma amostra de 1,8 mL da suspensão de bactérias. Tais amostras de células bacterianas, coletadas nos momentos antes e após indução com IPTG, passaram pelo processo de centrifugação a 10.000 g por 2 min e descarte do meio de cultura líquido. Este *pellet* obtido foi utilizado para extração e confirmação da produção de dsRNA.

O processo de extração de dsRNA utilizado foi o mesmo descrito por Timmons *et al.* (2001). Ao tubo de microcentrífuga contendo o *pellet* de bactéria, foi adicionado 800 μL de 1 M de acetato de amônio / 10 mM de EDTA e 800 μL de Fenol: clorofórmio álcool isoamílico (25:24:1 v:v:v). As amostras foram incubadas a 65°C por 30 min. Em seguida, a fase sobrenadante foi coletada e transferida para um novo microtubo. O volume equivalente à fase sobrenadante coletada foi adicionado de isopropanol e, as amostras foram incubadas a -20°C *overnight*. A próxima etapa consistiu na centrifugação a 10.000 g por 30 min a 4°C. Descartou-se o isopropanol e aguardou-se a secagem do *pellet* para então, fazer a eluição do mesmo em 10 μL de tampão Tris-EDTA (pH 7,5) (Timmons *et al.*, 2001). As amostras foram

então tratadas com DNaseI (Invitrogen) com a finalidade de obter somente amostras de RNA extraídas das bactérias. O dsRNA produzido e presente nas amostras foi então observado por eletroforese em gel de 2% agarose em tampão TAE colorido com brometo de etídeo.

Uma vez confirmada a produção de dsRNA pelas bactérias induzidas, elas foram adicionadas à dieta artificial das lagartas de *D. saccharalis*. O objetivo do experimento consistia em avaliar a indução do gene *Ds_up56* após a ingestão de moléculas de dsRNA, neste caso, *dsGFP*, já que Guan *et al.* (2018) relatou uma regulação positiva do gene *up56* mediante absorção de dsRNAs. O volume de solução bacteriana HT115 expressando *dsGFP* recebeu 5% de corante artificial alimentício azul (Coralim, Mix, São Bernardo do Campo Brasil) para melhor visualização do espalhamento da solução bacteriana sobre a dieta artificial. A dieta artificial dos insetos foi preparada (ANEXO: Tabela 1) e após o cozimento, foi vertida em tubos de vidro de fundo chato autoclavados tampados com algodão hidrófilo. Após o total resfriamento e solidificação da dieta artificial nos tubos de vidro, 65 µL de suspensão bacteriana foi dispensado sobre a superfície da dieta artificial de cada tubo. Os tubos foram mantidos por 24 h em temperatura ambiente para que a suspensão bacteriana pudesse ser absorvida pela dieta. Após esse período, cinco lagartas neonatas de *D. saccharalis* foram introduzidas por tubo (Figura 1).

O experimento contou com 16 tubos por tratamento, sendo que os tratamentos controle incluíram tubos contendo somente dieta artificial sem adição de suspensão bacteriana ou adição de bactéria transformada com o vetor de silenciamento vazio (pL4440) (Figura 2). O experimento foi mantido em câmara climatizada a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, fotofase de 14 h e UR 70%.

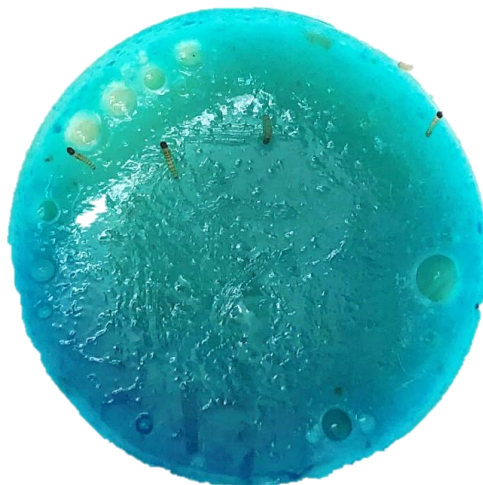


Figura 1. Inoculação de lagartas neonatas de *Diatraea saccharalis* nos tubos de dieta artificial contendo suspensão bacteriana expressando *dsGFP*, corada com corante alimentício azul.

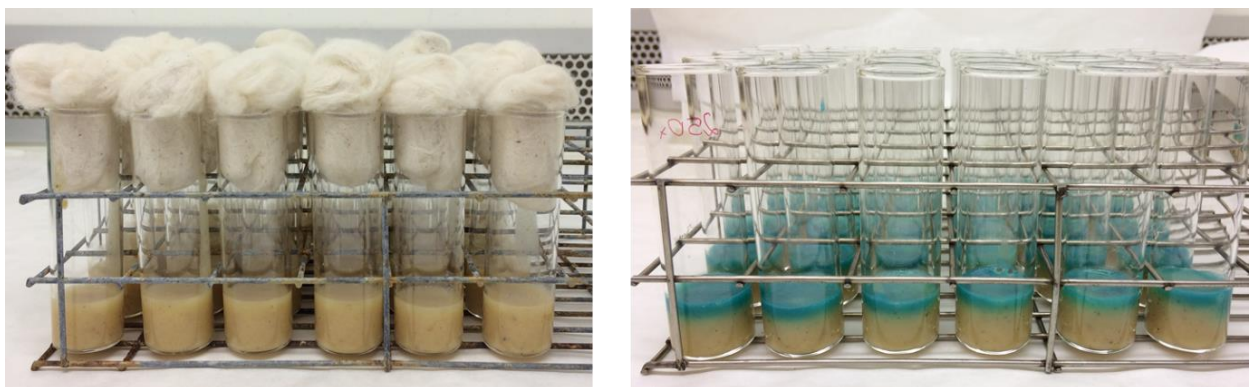


Figura 2. À esquerda, tubos de vidro contendo somente dieta artificial de *Diatraea saccharalis*. À direita, tubos de vidro contendo dieta artificial de com suspensão bacteriana expressando dsGFP, corada com corante alimentício azul, adicionada à superfície dieta.

A partir daí, nos tempos de 2 h, 4 h, 6 h e 8 h após a alimentação, foram coletadas amostras de lagartas em microtubos (4 tempos de coleta x 4 repetições biológicas / *pools* x 3 tratamentos). O material foi armazenado em nitrogênio líquido no exato momento da coleta e, em seguida, em ultrafreezer -80°C .

As amostras foram então maceradas e prosseguiu-se com a extração de RNA com o *kit Direct-Zol RNA Miniprep* (Zymo Research, Irvine, CA, EUA). Algumas amostras foram aleatoriamente selecionadas para conferir a qualidade do RNA extraído, através de visualização por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão TAE. Para a determinação da concentração do RNA total extraído, uma alíquota de $2\ \mu\text{L}$ foi submetida à leitura em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

4.2.4. Síntese de cDNA das amostras do experimento de fornecimento de dsGFP para lagartas de *D. saccharalis* para verificar a expressão de *Ds_up56*

Após a extração de RNA e quantificação das amostras, *primers* para análise de expressão do gene *Ds_up56*, via RT-qPCR foram desenhados utilizando o *software* Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Foi realizada a síntese de cDNA a partir do RNA extraído. Para isto, $2\ \mu\text{g}$ do RNA total foram tratados com DNase I (Invitrogen), com a adição de $2\ \mu\text{L}$ de 10X *DNase I Reaction Buffer* e 2 U de DNase I. A mistura foi incubada a 25°C por 15 min em termociclador Veriti (Applied Biosystems), e após este período, foi adicionado $1\ \mu\text{L}$ de 25 mM EDTA e incubada por 10 min a 65°C . A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit de transcrição *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Para isso, $1\ \mu\text{g}$ do RNA tratado, $250\ \mu\text{M}$ de cada dNTP e $2\ \mu\text{M}$ de Oligo dT foram submetidos a 65°C por 5 min e resfriadas em gelo. Logo após, foram adicionados $4\ \mu\text{L}$ de tampão 5X *First Strand Buffer*

(Invitrogen), 1 μ L de 0,1M DTT e 20 U de *Ribolock RNase Inhibitor* (Fermentas) e 200 U da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) em um volume final de 20 μ L. A reação foi incubada por 25°C por 5 min, 50°C por 60 min, e 70°C por 15 min. As amostras de cDNA foram então diluídas à 10^{-1} .

4.2.5. Análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) do gene *Ds_up56* após ingestão de dsGFP por lagartas de *D. saccharalis*

As reações de RT-qPCR foram realizadas com 5 ng de cDNA (quantificado em NanoDrop 2000), 5 μ L de *SYBR Green Platinum* (Invitrogen), 0,2 μ M de cada *primer* (ACGTGCCTGATAACGTCAGA; CACTGCACACTTCAACGGTC; tamanho do amplicon = 90 pb) num volume final de 10 μ L de reação. Tanto os *primers* de *Ds_up56* como do gene de referência, *RPS19*, foram submetidos à uma análise de eficiência de amplificação por PCR usando o *software Miner* (Zhao & Fernald, 2005) (ANEXO – Tabela 2). Foram utilizadas como controles negativos, lagartas que se alimentaram somente da dieta artificial e lagartas que receberam juntamente com a dieta, uma solução de bactérias *E. coli* HT115 (DE3) transformadas com o vetor de silenciamento pL4440 vazio. O perfil de reação foi estabelecido da seguinte maneira: 50°C por 10 min e 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 25 s, e 72°C por 30 s realizadas no termociclador RotorGene-6000 (Qiagen). A análise de RT-qPCR do gene *Ds_up56* foi realizada em duplicata técnica e quadruplicata biológica, com controle negativo sem cDNA. Os valores de C_Q foram utilizados para determinar a diferença de expressão gênica de acordo com: razão = $2^{-\Delta(\Delta C_Q)}$, sendo $\Delta C_Q = C_Q$ (gene alvo) – C_Q (gene referência) e o $\Delta = \Delta C_Q$ (tratamento) – ΔC_Q (controle) (Schmittgen & Livak, 2001). Após a determinação dos valores de expressão gênica, estes foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e os valores médios dos tratamentos foram comparados pelo teste Tukey, com 5% de significância, utilizando R (R Core Team, 2017).

4.2.6. Determinação da expressão basal de *Ds_up56*: Coleta de ovos e de lagartas do 1º ao 6º instar larval de *D. saccharalis*

Para determinar a expressão gênica basal de *Ds_up56*, foram coletados ovos e lagartas representando cada um dos seis ínstar de *D. saccharalis*. Casais de adultos de *D. saccharalis* foram colocados em gaiolas de PVC (20 x 22 cm), com o interior revestido com papel sulfite como local para realização das posturas, e foi adicionada solução de açúcar a 5% para alimentação dos adultos. Imediatamente após a postura, os ovos foram coletados e esterilizados com sulfato de cobre (1%), e posteriormente armazenados em placas de Petri (15

x 2 cm) forrada com papel filtro, onde foram mantidos por cerca de cinco dias. As placas foram acondicionadas em câmara BOD com temperatura próxima a 25°C e umidade relativa de 70%. Durante esse período, foram realizadas coletas em dias alternados, totalizando três coletas (Figura 3). Em cada dia, foram coletadas seis replicatas. Com o auxílio de um pincel, um total de 50 ovos, era armazenado em microtubos de 1,5 mL (Figura 4). Imediatamente após a coleta, o material era armazenado em nitrogênio líquido e, depois, em ultrafreezer - 80°C.



Figura 3. Ovos de *Diatraea saccharalis*, armazenados em placa de Petri por cerca de cinco dias, utilizados para coletas em dias alternados.

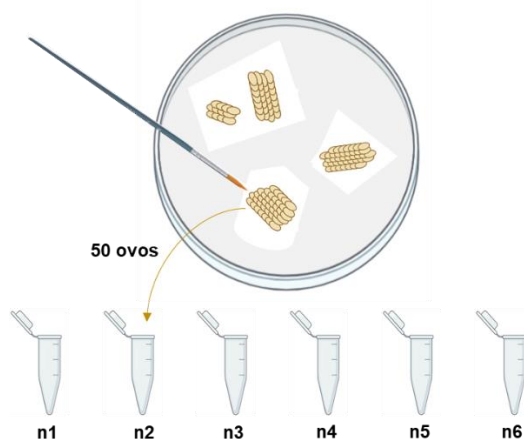


Figura 4. Esquema da coleta dos ovos de *Diatraea saccharalis* para síntese de cDNA. Cada replicata (n) contendo 50 ovos.

Para determinação dos ínstares foi utilizado o método de medição da largura da cápsula cefálica das lagartas e, em seguida, as medidas obtidas foram comparadas à tabela desenvolvida no Laboratório de Biologia de Insetos do prof. José Roberto Postalí Parra, no Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP (Tabela 2).

Tabela 7. Determinação dos ínstar de lagartas de *Diatraea saccharalis* por meio da medição da largura da cápsula cefálica. Desenvolvida no Laboratório de Biologia de Insetos do prof. José Roberto Postali Parra, no Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP.

Instar	Largura da cápsula cefálica (mm)		Razão crescimento	Duração (dias)
	Int. Variação	Média		
1°	0,30 - 0,34	0,32	-	3,88
2°	0,38 - 0,44	0,40	1,25	3,75
3°	0,49 - 0,85	0,69	1,72	4,1
4°	0,88 - 1,18	1,01	1,46	2,26
5°	1,21 - 1,65	1,46	1,44	2,69
6°	1,85 - 1,93	1,86	1,27	5,36
Média da razão de crescimento			1,42	

Condições de criação das lagartas: alimentação em dieta artificial à base de caseína e germe de trigo (Henseley & Hammond, 1968); temperatura de 30°C; umidade relativa igual a $70 \pm 10\%$; fotofase de 14h; lagartas individualizadas (sem distinção de sexo).

Foram coletados em microtubos amostras com 40 lagartas de 1° e 2° ínstar, 15 lagartas de 3° e 4° ínstar e 6 lagartas de 5° e 6° ínstar (Figura 5). O material foi imediatamente armazenado em nitrogênio líquido e em seguida, em ultrafreezer -80°C.



Figura 5. Lagartas de *Diatraea saccharalis* do primeiro ao sexto instar, seguindo da esquerda para direita.

4.2.7. Determinação da expressão basal de *Ds_up56*: Extração de RNA e síntese de cDNA a partir dos ovos e lagartas coletadas de *D. saccharalis*

A extração do RNA total das amostras de ovos foi realizada com o kit *Direct-Zol RNA Miniprep*. Já para a extração do RNA total das amostras de lagartas, foi utilizado o reagente TRIzol (Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. Todas as soluções utilizadas para a extração de RNA foram preparadas com água 0,01% dietilpircarbonato (DEPC) inativa (autoclavada). A concentração do RNA total extraído foi determinada em NanoDrop 2000 e sua integridade foi examinada por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão 1X SB (10 mM NaOH, pH 8,5; ajustado com ácido bórico) (Brody & Kern, 2004) a 3

V cm⁻¹. A síntese de cDNA ocorreu seguindo os mesmos passos descritos no item 2.2.3. Da mesma forma, a metodologia aplicada para a análise de transcritos reversos do gene *Ds_up56*, a fim de verificar sua expressão basal ao longo dos estágios de desenvolvimento do inseto, seguiu conforme descrito em 2.2.4.

4.2.8. Amplificação e clonagem de fragmento do gene *Ds_up56* para produção de dsRNA

No item 2.2.1 descrevemos a amplificação e obtenção do fragmento do gene *up56* de *D. saccharalis*, que apesar de não corresponder à sequência completa do gene, compreendeu uma sequência longa com um total de 1440 nucleotídeos. No entanto, sabendo que a eficiência do RNAi está relacionada, entre diversos fatores, ao tamanho da molécula de dsRNA, e que moléculas de 200 a 550 pb são mais eficientes no silenciamento gênico (Joga *et al.*, 2016), buscamos amplificar uma região menor do gene em questão, para que ao ser ligado no vetor de silenciamento pL4440 e transformado em *E. coli* HT115 (DE3), o dsRNA expresso possua o tamanho ideal.

Primers específicos foram desenhados com o objetivo de amplificar uma região de 450 pb do gene *Ds_up56*. Esta região foi escolhida com base na maior proporção de nucleotídeos GGA (Figura 6), visto que a clivagem *in vivo* de dsRNAs têm preferência por essa sequência em insetos, sendo que um maior número de siRNAs são produzidos quando as moléculas de dsRNA possuem em regiões ricas em GGUs, resultando em maior eficiência de silenciamento gênico (Miao *et al.*, 2018). A reação de amplificação do gene *Ds_up56* foi realizada contendo cerca de 100 ng do mix de cDNA de lagartas de todos os instares do inseto (1° ao 6° instar), 2,5 mM de MgCl₂, 100 μM de dNTP, 0,1 μM de cada *primer* (TTGGCGACATTTATTCTTTT; AATACCCAAAGAGAGGAACA; tamanho esperado do amplicon: 450 pb) e 2 U de *Taq* polimerase em tampão de (NH₄)₂SO₄ em volume final de 25 μL. As condições do termociclador foram 95°C por 2 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 47°C por 30 s, 72°C por 50 s, com 72°C por 5 min de extensão final. A reação foi submetida à eletroforese em gel de 1% agarose em tampão TAE e o fragmento de interesse foi extraído do gel e purificado com o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) de acordo com as orientações do fabricante. Então, o fragmento purificado foi clonado em vetor pGEM-T *Easy* (Promega,). Para isso, cerca de 25 ng de DNA amplificado, purificado e quantificado em *DyNA Quant 200 fluorometer* foi aliqotado em microtubo juntamente com tampão de ligação, 50 ng de vetor pGEM-T *Easy* e 5 U de T4 DNA ligase (Promega) e incubados a 4°C por 16 h em reações de 10 μL. Em seguida, 2 μL da reação foram utilizados

para a transformação de *E. coli* eletrocompetente, cepa DH5 α (*Gene Pulser*, BioRad, -2,5kV, 25 μ F, 200 Ω , cubetas de 0,2 cm). Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio contendo 100 mg L⁻¹ de ampicilina, 40 μ g mL⁻¹ de X-Gal e 0,1 mM de IPTG para seleção das bactérias transformantes. Bactérias positivas para a transformação foram inoculadas em meio LB líquido contendo 100 mg mL⁻¹ de ampicilina e a presença do inserto foi confirmada pela extração do DNA plasmidial por lise alcalina. Para confirmar a identidade do gene de interesse, os plasmídeos foram sequenciados empregando o kit *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing*, em sequenciador *3500 Genetic Analyser* (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento empregaram o *primer* T7 ou SP6, e foram conduzidas sob as seguintes condições de reação: 35 ciclos de 95°C por 15 s, 50°C por 15 s e 60°C por 2 min.

```

ACAGTCGAATTTGCCATCCGAATTTGGAAGTGAAAGTGATAAATACGCTGATTATTTACGAAAA
TTCTTGGGAATTTTAAAAAAGCAAACATAAAATGTTATTTCTATTCAAAGGAGGCGATGGTG
GCATTGTTTCGGGAAAAAGATAAAGATGATGTCATGAAAGCAAATATTTGTAAACCAATATT
CATGAAAGATATATACAAACAAGTCCTTGACGAAATGGATTTGACTATGTCATTTGTGAATTT
GAAAGTAAAGACATTGTATCACCCCTGGCCCAAAACCTCAATGCCCTCTGATTAGCTTTGACG
TGGAATTTTGTTTTCGGGAGAACCCCTACATACCCATCAACCATAATGATAAACGTTTATGTTA
TGATGACAATACAAATTCAGTTCACCTGTGAATTTATTTGATTATTATGATTTTATAAAAAAATAC
AATTTGACCAAGAAAAATTTGGCGACATTTATTTCTTTAACAGATGAGTATATTTTCTAAC
ATCTCCAACAAAACATAAATGTTGCAATAAACATAAGGGTATATAATACTTACCAACGAAATTT
ATATTTATTGAATTTGGCTATCCAAGCGTGAAGATGAACAAATCAAAGGATTATTCATAAATAC
TTGCAACCAGATGACATCAATGAATTTGAAATGAAAAAATAAAAGTTATTGAATTTATCTGCA
AGAAAGTTACTCTGGCATACTTACTATTATTTAACGATAAACATATTGAATTCATTGA
GAACGATCCATTGTTTCGAAAAAGGTGTAGCATCTGGCTACGTTGCTTTACGGTATGTCAAC
ATTTTACTCTGGAATATTATCGAAGGATCTTGGTGCCTTGAAGACCCAGAGGCAGAAGACGCTA
TGTTCTCTCTTTGGGTATTAATAAATATGCATTTAATCTTTTGACAACTTCGAGAGAAAAGA
ATTACGATTTGTTAATAACAAAATGAAGTAGTAACCATCAATACTGCTGACGAGACTTCAATT
CCCAAACCTACGTATGAAGCTCTTCAGAGTCCATTTGAAAACGGATGGGACCAAATAAAGCTT
TGAGATTATTGAACATTTTCTTGAAAAATCATTGCCAAATGCAGACTTCAGCATCTGAACCA
CGTGCCTGATAACGTCAGACTTTTGATTATAGCTTTAGTCTATTTTCAAACAGAAACCTGAA
AATACGACCGTTGAAAGTGTGAGTGTCTTTATCATACGTTATTTGAGTGTTCGCGCGAAA
AATCTAACAGCAGTAATAATAAAGCAGAAAGTAGTTTCAAGGCCGTATATGGACTCGTTTAC
CGATGAGAACCTCGTAACGAAATGGATAGTGATATAGCTAAATCCGTAATGAATAAATTTTC
TATACAGATTCAACTCCGCAAAACTGGCAAC

```

Figura 6. Sequência parcial do gene *up56* de *Diatraea saccharalis* (*Ds_up56*). Em coloração cinza, destacam-se os nucleotídeos GGTs, que constituem sítios preferenciais para produção de siRNAs. Em negrito sublinhado estão os *primers* escolhidos para amplificação de uma região do gene *Ds_up56* (450 pb) para a finalidade de produção de dsRNA.

4.2.9. Clonagem de *Ds_up56* em vetor de silenciamento pL4440 e transformação em *Escherichia coli* HT115 (DE3)

O vetor pGEM-T *Easy* contendo o fragmento do gene *Ds_up56* como inserto foi digerido utilizando a enzima de restrição *NotI* por 16 h a 37°C. O mesmo procedimento foi realizado com o vetor de silenciamento pL4440, a fim de linearizar o vetor, tornando-o apto a receber o inserto. Após este período, o produto da digestão foi verificado em gel de 1% agarose. Após a observação das bandas de peso molecular esperadas, estas foram recortadas do gel de agarose e purificadas com *kit* de purificação *GFX PCR DNA and Gel Band*

Purification Kit (GE Healthcare). Em seguida, o fragmento do gene e o plasmídeo pL4440 foram quantificados em fluorímetro DyNA Quant 200 fluorometer. A partir daí, foi realizada a reação de ligação do fragmento gênico ao plasmídeo pL4440, utilizando enzima de ligação T4 DNA ligase (Invitrogen). Após, seguiu-se a transformação por eletroporação em células competentes de *E. coli* (DH5 α), seguida de plaqueamento em meio LB com ampicilina (100 mg mL⁻¹) mantidas a 37°C durante 16 h. Após este período, colônias foram repicadas individualmente em meio LB líquido com ampicilina (100 mg mL⁻¹) e crescidas a 37°C durante 16 h sob agitação. Para confirmação das colônias transformadas, foi realizada uma minipreparação plasmidial seguida de digestão com *EcoRV*. Em seguida, foi feita a confirmação da clonagem por sequenciamento e as bactérias transformadas positivas foram estocadas a -80°C.

O DNA plasmidial extraído dos clones positivos pL4440: *Ds_up56* foi então utilizado para a transformação das bactérias *E. coli* HT115 (DE3) conforme descrito previamente. Após este período, as bactérias transformadas foram estocadas a -80°C para serem fornecidas, via alimentação, às lagartas de *D. saccharalis*.

4.2.10. Fornecimento de ds*Ds_up56* a lagartas de *D. saccharalis*

Colônias individuais de bactérias HT115 (DE3) contendo a construção pL4440: *GFP* e colônias de HT115 (DE3) transformadas com a construção pL4440: *Ds_up56* foram cultivadas durante 14 h em meio LB com 100 mg mL⁻¹ de ampicilina mais 12,5 mg mL⁻¹ de tetraciclina a 37°C e sob agitação (120 rpm). Além disso, colônias de HT115 (DE3) transformadas com pL4440:*CHI* também foram cultivadas sob as mesmas condições. A preparação das suspensões bacterianas foram feitas conforme descrito em 2.2.3A dieta artificial dos insetos (Tabela 1 do ANEXO) foi preparada e após o cozimento, foi vertida em tubos de vidro de fundo chato autoclavados e tampados com algodão hidrófilo. Após o total resfriamento e solidificação da dieta artificial nos tubos de vidro, 100 μ L de suspensão bacteriana foi dispensada sobre a superfície da dieta de cada um dos tubos. O experimento foi composto por quatro tratamentos, sendo eles: a) tubos contendo somente dieta artificial (controle negativo); b) tubos contendo dieta artificial + 100 μ L solução bacteriana de *E. coli* HT115 (DE3) transformada com pL4440 (vetor vazio) (controle negativo); c) tubos contendo dieta artificial + 100 μ L *E. coli* HT115 (DE3) expressando ds*CHI* e; d) tubos contendo dieta artificial + 50 μ L *E. coli* HT115 (DE3) expressando ds*CHI* + 50 μ L *E. coli* HT115 (DE3) expressando ds*Ds_up56*.

Para todos os tratamentos, os tubos foram mantidos por 24 h em temperatura ambiente

para que a suspensão bacteriana pudesse ser absorvida pela dieta. Após esse período, as lagartas neonatas de *D. saccharalis* foram introduzidas por tubo. Cada tratamento foi composto por 16 tubos, cada um contendo 5 lagartas neonatas, as quais foram utilizadas posteriormente para a extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão gênica. Além disso, outros 18 tubos para cada tratamento foram mantidos com apenas 1 lagarta por tubo por cerca de 30 – 40 dias, até completarem o ciclo biológico do inseto, para avaliação de parâmetros fenotípicos, tais como: mortalidade larval (%), duração do ciclo larval (dias) e peso de pupa (g).

O experimento foi mantido em BOD climatizada a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, fotofase de 14 h e UR 70%. Então, 6 h após a alimentação, as lagartas foram coletadas em microtubos. Para cada um dos tempos, foram coletadas 15 lagartas por tubo, num total de 4 tubos/*pools* por tratamento. Este material foi armazenado em nitrogênio líquido no exato momento da coleta e, em seguida, em ultrafreezer -80°C .

4.2.11. Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão gênica

A extração do RNA total das lagartas das amostras foi realizada com o *kit Direct-Zol RNA Miniprep*. A síntese de cDNA ocorreu seguindo os mesmos passos descritos no item 2.2.3. Da mesma forma, a metodologia aplicada para a análise de transcritos reversos tanto do gene *Ds_up56* como do gene-alvo *CHI*, seguiu conforme descrito em 2.2.4, utilizando-se os *primers* específicos para cada gene (Gene *CHI*: TCCGACCACCGAAGAAATAC; TGTGACGAATCTTTGCCTTG; tamanho do amplicon = 111 pb; Gene *Ds_up56*: ACGTGCCTGATAACGTCAGA; CACTGCACACTTCAACGGTC; tamanho do amplicon = 90 pb).

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Identificação e análise filogenética da REase em *D. saccharalis*: uma nuclease específica que suprime o RNAi

A sequência parcial do gene *up56*, que codifica a proteína REase, num total de 1440 nucleotídeos, foi obtida a partir da busca no transcriptoma de *D. saccharalis*. Análises de similaridade de sequências no Genbank indicaram que genes com alta identidade ao encontrado para *O. furnacalis* foram anotados como proteínas não caracterizadas e homólogos de proteínas asteroides. No entanto, uma análise de domínio proteico revelou que a proteína REase pertence a uma família de proteínas que contém um domínio PIN na extremidade 5' (amino terminal), com a presença de três resíduos ácidos estritamente conservados (Guan *et*

al., 2018).

Partindo desta informação, foi realizada uma busca no transcriptoma de *D. saccharalis* por proteínas anotadas inicialmente como proteínas asteroides, mas que pudessem na realidade, corresponder à REase. A partir das sequências encontradas, procedeu-se uma análise de identificação de domínios proteicos através da ferramenta computacional *online* InterPro v.70. Dentre as sequências de transcritos possíveis encontrados para *D. saccharalis*, aquela na qual foi encontrado o domínio PIN, característico da proteína REase, foi selecionada para prosseguir para as próximas etapas. Para investigar a identificação correta, uma árvore filogenética foi construída usando 36 sequências de 33 espécies pertencentes a seis ordens de insetos pelo método *neighbor-joining* (Figura 7).

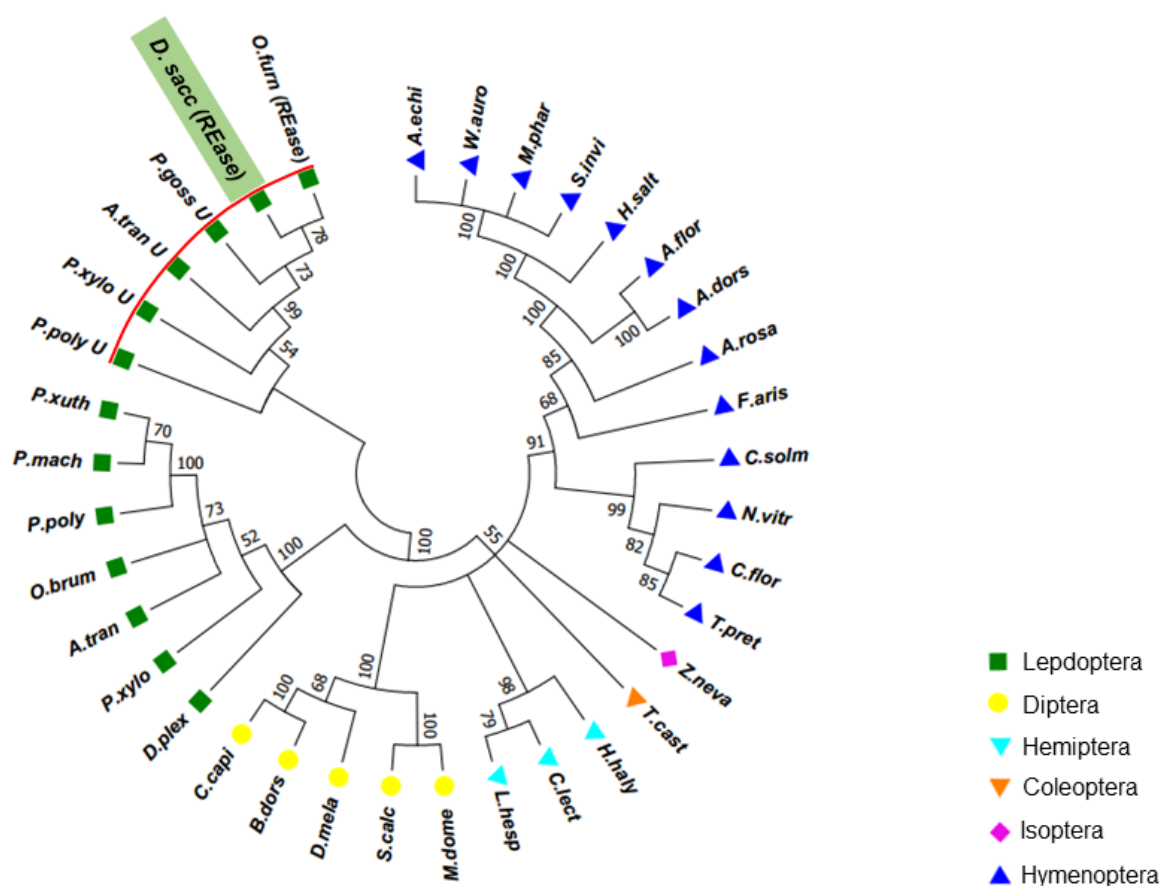


Figura 7. Árvore filogenética construída utilizando 36 sequências de aminoácidos de 33 espécies de insetos (Tabela 2) pelo método de vizinhança (1000 repetições). As proteínas são oriundas de espécies de seis ordens de insetos, as quais são identificadas sob *cores* distintas. REase de *Diatraea saccharalis* encontra-se agrupada em um ramo com cinco outras proteínas não caracterizadas, as quais estão sublinhadas em vermelho, junto com a original identificada em *Ostrinia furnacalis*.

A REase de *D. saccharalis* se agrupou em um ramo com cinco outras proteínas não caracterizadas, incluindo a REase de *O. furnacalis*, em cuja espécie esta proteína foi

primeiramente descrita (Guan *et al.*, 2018). Todas as demais 30 proteínas, que foram nomeadas como asteroides, se reuniram em outros ramos. Ressalta-se que todos os genes de proteínas não caracterizadas presentes no ramo juntamente com a REase de *D. saccharalis*, estavam presentes apenas nos insetos lepidópteros (Figura 7 - sublinhado vermelho).

Adicionalmente, foi feita uma análise de alinhamento de sequências múltiplas para quatro proteínas não caracterizadas em lepidópteros (Figura 8). A similaridade entre as sequências de aminoácidos encontrada foi em torno de 30%. A análise de domínios proteicos revelou que esta família de proteínas contém um domínio PIN no terminal amino (Figura 8 - sublinhado verde; PFAM 01850). Três resíduos ácidos estritamente conservados estão destacados por asteriscos vermelhos. Apesar destes três resíduos conservados no domínio PIN, esse gene apresenta uma diversidade de sequências muito alta entre espécies (Arcus *et al.*, 2011). As proteínas do domínio PIN são encontradas em eucariotos e procariontes, onde funcionam como nucleases que estão envolvidas no decaimento de mRNA (Glavan *et al.*, 2006; Baker & Parker, 2004; Takeshita *et al.*, 2007). Portanto deduz-se que a REase possivelmente pode ser um novo membro da família de domínios PIN com atividade de nuclease (Guan *et al.*, 2018).

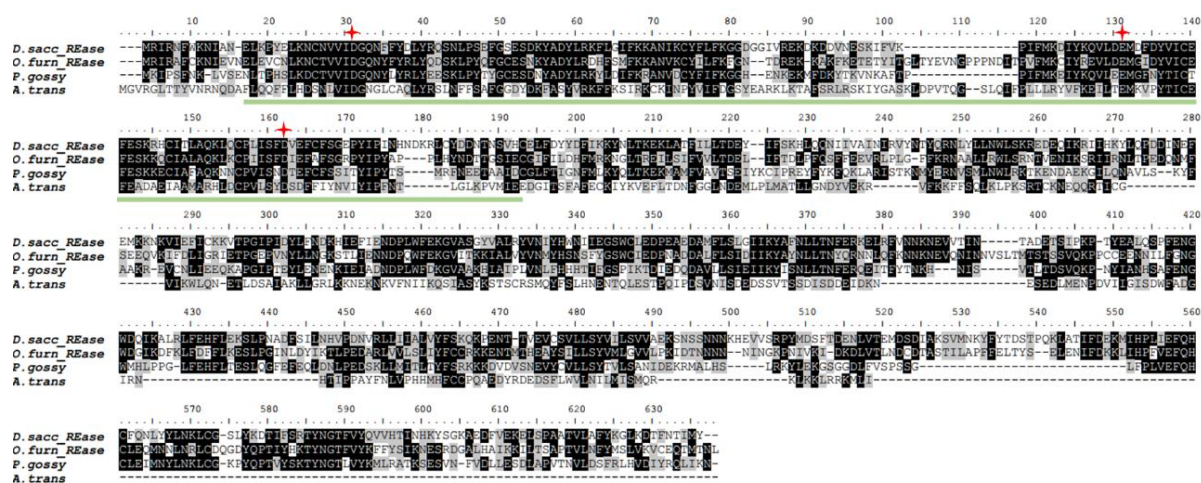


Figura 8. Alinhamento múltiplo dos quatro genes que codificam proteínas não caracterizadas e REases em insetos da ordem Lepidoptera, sendo eles *Diatraea saccharalis*, *Ostrinia furnacalis* (AYE20402.1), *Pectinophora gossypiella* (JAT88369.1), e *Amyelois transitella* (XP_013200440.1). A região sublinhada em verde mostra o domínio PIN no terminal amino da proteína REase. Os três asteriscos vermelhos que aparecem na figura mostram os resíduos ácidos estritamente conservados.

É reconhecido que a eficiência do RNAi é relativamente baixa em insetos lepidópteros em comparação com muitas outras espécies (Terenius *et al.*, 2011; Cooper *et al.*, 2018; Zhu &

Palli, 2020). A degradação de dsRNA por nucleases ou pelo próprio pH do trato digestório, a baixa eficiência de absorção e o transporte celular dessa molécula devido ao aprisionamento endossomal das moléculas de dsRNA e a presença de infecções virais com produção de supressores RNAi, tem sido apontadas como as principais razões para a eficiência limitada do RNAi entre lepidópteros (Terenius *et al.*, 2011; Wynant *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2017; Vogel *et al.*, 2018; Cooper *et al.*, 2019; Grover *et al.*, 2019; Christiaens *et al.*; 2020). Foi demonstrado que o dsRNA pode permanecer estável por muito mais tempo em muitos coleópteros em comparação com a maioria dos lepidópteros (Shukla *et al.*, 2016; Garbutt *et al.*, 2013; Ivashuta *et al.*, 2015). Além disso, resultados encontrados para a espécie *O. furnacalis* sugerem que a enzima REase ou *REase-like*, presente no intestino médio dos insetos da ordem Lepidoptera, é provavelmente a principal razão para essa recalcitrância ao RNAi. Foi demonstrado que esta nuclease, específica de lepidópteros, pode digerir dsRNA antes do processamento pela Dicer e, assim, afetar a eficiência do RNAi, explicando a baixa eficiência de RNAi em Lepidoptera (Guan *et al.*, 2018).

O domínio PIN, característico desta proteína, identificado na REase de *D. saccharalis*, é encontrado também em nucleases presentes em *C. elegans*. Neste organismo, a proteína com domínio PIN *smg-5* está envolvida na regulação do RNAi e os ortólogos em levedura *smg-2* e *Upf1p*, os quais também possuem domínios PIN, participam em mecanismos de RNAi (Page *et al.*, 1999; Domeier *et al.*, 2000). Domínios PIN parecem ser componentes de proteínas envolvidas tanto no decaimento de mRNA não-senso (Baker & Parker, 2004; Takeshita *et al.*, 2007) quanto em vias de RNAi (Guan *et al.*, 2018; Cooper *et al.*, 2020). A descoberta deste novo domínio PIN compondo proteínas nucleases na ordem Lepidoptera, podem fornecer uma indicação para o estudo da eficiência do RNAi em insetos dessa ordem.

Assim, acredita-se que a ausência de indícios de silenciamento encontrada nos bioensaios de otimização com entrega de dsRNA por meio de bactérias *E. coli* HT115 (DE3) à *D. saccharalis* (ver Capítulo 3) devem-se à presença e a ação desta mesma proteína REase, aqui identificada neste inseto-alvo.

4.3.2. Identificação do gene *up56* de *D. saccharalis* (*Ds_up56*): BLAST contra o transcriptoma do inseto

A análise *in silico* das sequências de transcritos obtidas com o transcriptoma de *D. saccharalis* já havia sido realizada para a busca de possíveis transcritos que correspondessem ao gene *up56*, conforme descrito em 2.3.1. Esta análise inicial baseou-se na anotação funcional dos *contigs*, bem como na análise de similaridade no Genbank com outras

sequências homólogas a este gene em demais insetos, principalmente lepidópteros. Além disso, também foi feita uma reconstrução filogenética na qual foram utilizadas 35 sequências, as mesmas usadas por Guan *et al.* (2018). Com isto, foi localizado o transcrito referente ao gene *up56* de *D. saccharalis*, que correspondia ao *contig* “comp54701_c0_seq”. Este *contig* corresponde à sequência parcial do gene *Ds_up56*, que codifica a proteína REase, com 1440 nucleotídeos, enquanto a sequência completa original da REase de *O. furnacalis* possui 1.866 nucleotídeos (Guan *et al.*, 2018). A partir desta sequência, foram feitas análises funcionais preditivas, buscando-se domínios característicos de proteínas da família REase, como o domínio PIN que foi encontrado. Além disso, foi feito um alinhamento de sequências múltiplas para quatro proteínas não caracterizadas em lepidópteros que possivelmente também correspondem à REase (Figura 8).

Uma análise adicional empregou tBLASTx contra o transcriptoma de *D. saccharalis* e utilizando como sequência referência (*query*) a do gene *up_56* identificado para *O. furnacalis* (Guan *et al.*, 2018). Dentre os 126 mil *contigs* obtidos no transcriptoma, o “comp54701_c0_seq” foi o que apresentou maior similaridade com a sequência referência do gene *up56*, com uma cobertura de 77% (*e value* = $1.56e^{-131}$). Outros dois *contigs* apareceram, “comp71296_c0_seq1” e “comp96179_c0_seq1”, no entanto, com uma cobertura muito baixa (22% e 10%, respectivamente) e maior *e-value* ($2.83e^{-07}$ e $4.57e^{-05}$, respectivamente). Além disso, após análise da sequência, não foi possível verificar a existência do domínio característico PIN e da região de aminoácidos conservados das proteínas da família REase nestes últimos dois *contigs*. Esta análise demonstrou que a identificação do gene *Ds_up56* estava apropriada e que o fragmento amplificado e clonado de fato se referia ao gene que codifica a enzima REase com domínio PIN em *D. saccharalis*.

Através de análise do transcriptoma da broca asiática do milho *O. furnacalis*, Guan *et al.* (2018) identificou pela primeira vez uma proteína codificada pelo gene *up56* de uma família de domínio PIN, a qual nomeou REase (*RNAi efficiency-related nuclease*). O gene mostrou ter sua expressão induzida em resposta à exposição a moléculas de dsRNA, parecendo ser específico de Lepidoptera e codificando uma nuclease diretamente relacionada à insensibilidade de RNAi nesta ordem de insetos. Mais tarde, identificou-se a existência do gene que codifica REase em *Helicoverpa armigera*, a *HaREase*, expresso principalmente no intestino médio, sendo também induzido por dsRNA (Guan *et al.*, 2019). Ainda, em *O. nubibalis*, um membro da família REase foi identificado também sendo predominantemente expresso no intestino médio de larvas, e apresentando regulação positiva de expressão mediante exposição a moléculas de dsRNA tanto por injeção quanto por alimentação (Cooper

et al., 2020). Do mesmo modo, a proteína descrita neste trabalho identificada em *D. saccharalis*, parece ser um membro desta mesma família de domínio PIN (PF01850), denominada REase.

Os domínios PIN são pequenos domínios proteicos de ~130 aminoácidos que são identificados pela presença de três resíduos ácidos estritamente conservados. Além desses três resíduos, há uma pobre conservação de sequência em toda a família (Arcus *et al.*, 2011). Bioquimicamente, os domínios PIN são ribonucleases e, em eucariotos, estão associados ao decaimento de mRNA mediado por mutações *nonsense*, ou seja, atuam eliminando transcritos que contêm códons de parada prematuros ou códons *nonsense*, evitando a formação de proteínas truncadas, incompletas ou não-funcionais (Baker & Parker, 2004; Takeshita *et al.*, 2007); e ao processamento do precursor do RNA ribossômico 18S (pré-rRNA 18S), permitindo a ligação da proteína ao sítio de clivagem D deste pré-rRNA 18S e clivando a molécula para originar o rRNA 18S maduro (Lamanna e Karbstein, 2009).

Em diversas espécies de lepidópteros, incluindo *O. furnacalis* e *O. nubilalis*, têm sido descrita a ocorrência de outros genes de nucleases expressos em diversos órgãos ou tecidos de larvas (Guan *et al.*, 2018; Guan *et al.*, 2019; Cooper *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2020b; Fan *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2021; Yao *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022). Todavia, a maioria dessas proteínas descritas pertencem a outra superfamília de nucleases, a endonuclease não específica de DNA/RNA (NUC), que se caracteriza pela presença do domínio endonuclease *non-specific* NS (PF01223). As proteínas desta superfamília NUC, nomeadas dsRNases, compartilham as seguintes características: atuam tanto no DNA quanto no RNA, clivam ácidos nucleicos de fita dupla e fita simples e requerem um íon bivalente, como o Mg, para sua atividade (Wang *et al.*, 2006). Estas nucleases participam de diversos processos celulares, incluindo digestão de DNA em vias de resgate de nucleotídeos (Rangarajan & Shankar, 2001), fragmentação de DNA durante a apoptose celular (Widlak & Garrard, 2005), deleção de nucleotídeos no reparo de DNA (Marti & Fleck, 2004), renovação de mRNA na regulação da transcrição (Parker & Song, 2004) e degradação de mRNA no silenciamento de genes (Carmell & Hannon, 2004; Lingel & Sattler, 2005).

O número de genes que codificam essas dsRNases identificados para cada espécie varia significativamente (Tabela 3). Na ordem Lepidoptera, um gene de dsRNase (domínio NS) foi identificado em *Cnaphalocrocis medinalis* (Li *et al.*, 2022), três foram identificados em *Plutella xylostella* (Chen *et al.*, 2021), quatro nas espécies *O. furnacalis*, *O. nubilalis* e *Spodoptera frugiperda* e (Fan *et al.*, 2021; Yao *et al.*, 2022; Cooper *et al.*, 2020) e cinco em *S. litura* (Peng *et al.*, 2020b). A variação do número de genes de dsRNase (domínio NS)

descritos podem derivar de razões biológicas ou por não terem sido todos identificados, mas quase todas as espécies apresentaram mais de um gene. Da mesma forma, a existências destas dsRNases da família NUC vêm sendo identificadas em insetos de outras ordens associadas à eficiência RNAi. No caso de Diptera, dois genes dsRNases foram identificados em *Drosophila suzukii*, denominados *DrosudsRNase1* e *DrosudsRNase2* (Yoon *et al.*, 2022). Em Coleoptera, uma busca pelo genoma de *Tribolium castaneum* identificou quatro genes que codificam nucleases de degradação de dsRNA da superfamília NUC, caracterizadas pela presença do domínio endonuclease NS (Peng *et al.*, 2020a). Além disso, em *Cylas puncticollis* e *Anthonomus grandis* foram identificados três genes dessas mesmas dsRNases (Prentice *et al.*, 2019; Garcia *et al.*, 2017), bem como outros dois genes em *Leptinotarsa decemlineata* (Spit *et al.*, 2017). Representantes de Orthoptera como *Schistocerca gregaria* e *Locusta migratoria* também possuem genes que codificam dsRNases, sendo que quatro deles foram identificados em ambas as espécies (Wynant *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2018). Finalmente, em *Bemisia tabaci*, Hemiptera, foram identificados três genes de dsRNases, pertencentes a grande subfamília DNA/RNA não específica (domínio NS) (Luo *et al.*, 2017).

Em contrapartida, quando nos referimos a identificação de proteínas REase, elas aparecem sempre sendo representadas por um único gene no organismo em que são expressas até o momento, seja em *O. furnacalis* – organismo em que foi originalmente identificada, como em *H. armigera*, *O. nubilalis* e agora, em *D. saccharalis*. É provável que este número de genes de cada nuclease esteja relacionado com sua especificidade e função que desempenham no organismo em que são expressas. No caso das dsRNases da superfamília NUC, elas atuam tanto na clivagem de DNA quanto de RNA, portanto, não possuem substrato específico (Wang *et al.*, 2006). Além disso, podem atuar em diversos processos celulares, que vão desde apoptose celular (Widlak & Garrard, 2005) até reparo de DNA (Marti & Fleck, 2004) e regulação da transcrição (Parker & Song, 2004), demonstrando novamente sua ampla gama de atividade e inespecificidade de substrato. Logo, por serem requeridas em diversos processos, os quais envolvem mais de um tipo de substrato, essas dsRNases seriam representadas por um maior número de genes no genoma dos insetos. Em contrapartida, as REases de domínio PIN identificadas até o momento em *O. furnacalis*, *H. armigera* e *O. nubilalis*, aparecem sempre representadas por um único gene no inseto (Guan *et al.*, 2018. Guan *et al.*, 2019; Cooper *et al.*, 2020), assim como ocorreu aparentemente com a REase de *D. saccharalis* que identificamos neste trabalho. Vale ressaltar que a identificação dessas REases PIN ocorreu a partir de dados de transcriptoma e não de genomas das espécies

investigadas. O fato de ser aparentemente apenas um gene expresso corrobora a especificidade desta nuclease de domínio PIN, que se caracteriza por possuir somente o RNA como substrato e que participa, de acordo com o que foi relatado até o momento, de apenas dois processos celulares fundamentais em eucariotos: decaimento de mRNA mediado por mutações *nonsense* (Baker & Parker, 2004; Takeshita *et al.*, 2007) e processamento do precursor do RNA ribossômico 18S (pré-rRNA 18S) (Lamanna e Karbstein, 2009).

Ainda neste contexto de diferença de especificidade das nucleases dsRNases e REases, destacamos que a maioria destas dsRNases NUC identificadas nos insetos, apesar de serem altamente ou ainda, preferencialmente expressas no intestino dos insetos (Peng *et al.*, 2020a; Peng *et al.*, 2020b; Cooper *et al.*, 2020; Yoon *et al.*, 2021; Wynat *et al.*, 2014; Spit *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2017; Garcia *et al.*, 2017), também foram encontradas sendo expressas em outros tecidos e partes dos insetos, como a hemolinfa - que está em segundo lugar no quesito expressão gênica, e também cabeça, carcaça, tegumento, tecido adiposo e glândula salivar (Li *et al.*, 2022; Fan *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2021; Cooper *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2020b; Peng *et al.*, 2020a; Prentice *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2017) (Tabela 3). Por outro lado, as REases de domínio PIN identificadas até o momento foram encontradas exclusivamente no intestino médio dos insetos (Guan *et al.*, 2018; Guan *et al.*, 2019; Cooper *et al.*, 2020).

Posto isto, podemos sugerir que as REases são mais específicas quanto à parte do corpo / tecido do inseto que são expressas, enquanto as dsRNases abrangem e atuam em um maior número de locais no corpo do inseto. Isso relaciona-se diretamente ao fato de que estas dsRNases atuam em um maior número de processos celulares, sendo necessário, portanto, estar presente em maior espaço tecido-celular. Neste trabalho especificamente, apesar de não ter sido avaliada a expressão de *Ds_up56* em diversos tecidos, como os resultados obtidos no capítulo anterior mostraram ausência de efeito RNAi em *D. saccharalis* mediante entrega de dsRNA via alimentação, é provável que a degradação destas moléculas de dsRNA tenham ocorrido diretamente no tecido onde foram absorvidas, ou seja, no intestino do inseto. Além disso, somando-se o fato de a maioria das nucleases serem predominantes no intestino com a elevada expressão dessas nucleases em estágios larvais e adulto e não em estágios embrionários e pupal (Yoon *et al.*, 2021), é possível sugerir que elas protegem os insetos contra moléculas de RNA estranhas recebidas durante períodos de alimentação. Logo, assumimos que a REase de *D. saccharalis* assume o mesmo papel.

Vale ressaltar aqui também que, de modo geral, a predominância de dsRNases e REases no intestino dos insetos é esperada, por mais que as primeiras possam estar presentes

em demais locais, justamente por serem mais ativas em pH alcalino e terem sua atividade suprimida em meio ácido e neutro (Peng *et al.* 2018), sugerindo que as diferenças no pH intestinal contribuem para a baixa eficiência do RNAi por ingestão.

Tabela 3. Relação de nucleases (REases e dsRNases) encontradas em insetos até o momento. Apresentam-se a ordem e espécie em que foram encontradas, bem como número de genes, a família proteica a que pertencem, domínio característico que possuem, domínio de desenvolvimento e tecido do inseto ela mais se expressa e se é ou não induzida por dsRNA.

Ordem	Espécie	Nº genes (nome dos genes)	Família Proteína	Domínio	Estágio de desenvolvimento com maior expressão	Tecido larval com maior expressão	Indução por dsRNA
Lepidoptera	<i>Diatraea saccharalis</i>	1 (<i>Ds_up56</i>)	REase	PIN	1º ao 6º instar larval	-	Up-regulated por dsGFP
Lepidoptera	<i>Ostrinia furnacalis</i>	1 (<i>up56</i>)	REase	PIN	-	intestino médio	Up-regulated por dsEGFP
Lepidoptera	<i>Helicoverpa armigera</i>	1 (<i>Ha_up56</i>)	REase	PIN	3º ao 5º instar larval	intestino médio	Up-regulated por dsEGFP
Lepidoptera	<i>Ostrinia nubilalis</i>	1 (<i>On_REase</i>) 4 (<i>OndsRNase1</i> , <i>OndsRNase2</i> , <i>OndsRNase3</i> e <i>OndsRNase4</i>)	REase e DNA/RNA endonuclease não específica	PIN e NS	<i>On_REase</i> : 3º ao 4º instar larval <i>OndsRNase1</i> : adultos machos <i>OndsRNase2</i> : 1º ao 5º instar larval <i>OndsRNase3</i> : ovos com 4 dias <i>OndsRNase4</i> : pupas e machos adultos	<i>On_REase</i> : intestino <i>OndsRNase1</i> e <i>OndsRNase3</i> : hemolinfa <i>OndsRNase2</i> : intestino <i>OndsRNase4</i> : careca e corpos gordurosos	<i>On_REase</i> : up-regulated por dsGFP <i>OndsRNase1</i> - <i>OndsRNase4</i> : Nenhum gene regulado positivamente após a ingestão ou injeção de dsRNA
Lepidoptera	<i>Spodoptera litura</i>	5 (<i>SldsRNase1</i> , <i>SldsRNase2</i> , <i>SldsRNase3</i> , <i>SldsRNase4</i> e <i>SldsRNase5</i>)	DNA/RNA endonuclease não específica	NS	4º ao 6º instar larval	<i>SldsRNase1</i> , <i>SldsRNase2</i> e <i>SldsRNase4</i> : intestino médio <i>SldsRNase3</i> : todo o corpo <i>SldsRNase5</i> : cabeça	-
Lepidoptera	<i>Ostrinia furnacalis</i>	4 (<i>OjdsRNase1</i> , <i>OjdsRNase2</i> , <i>OjdsRNase3</i> e <i>OjdsRNase4</i>)	DNA/RNA endonuclease não específica	NS	1º ao 5º instar larval	<i>OjdsRNase2</i> , <i>OjdsRNase3</i> e <i>OjdsRNase4</i> : intestino médio <i>OjdsRNase1</i> , <i>OjdsRNase3</i> e <i>OjdsRNase4</i> : hemolinfa	-
Lepidoptera	<i>Plutella xylostella</i>	3 (<i>PxdsRNase1</i> , <i>PxdsRNase2</i> e <i>PxdsRNase3</i>)	DNA/RNA endonuclease não específica	NS	<i>PxdsRNase1</i> : 4º instar larval <i>PxdsRNase2</i> e <i>PxdsRNase3</i> : 2º ao 4º instar larval	<i>PxdsRNase1</i> : hemolinfa <i>PxdsRNase2</i> e <i>PxdsRNase3</i> : trato intestinal <i>PxdsRNase4</i> : cabeça, tegumento e intestino	-
Lepidoptera	<i>Spodoptera frugiperda</i>	4 (<i>sfdsRNase1</i> , <i>sfdsRNase2</i> , <i>sfdsRNase3</i> , <i>sfdsRNase4</i> e <i>sfdsRNase5</i>)	DNA/RNA endonuclease não específica	NS	<i>sfdsRNase1</i> e <i>sfdsRNase3</i> : 3º instar larval <i>sfdsRNase2</i> e <i>sfdsRNase4</i> : 5º e 6º instar larval	intestino médio	-
Lepidoptera	<i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	1 (<i>CmdsRNase</i>)	DNA/RNA endonuclease não específica	NS	4º instar larval	hemolinfa	-
Diptera	<i>Drosophila suzukii</i>	2 (<i>DrosuadsRNase1</i> e <i>DrosuadsRNase2</i>)	DNA/RNA endonuclease não específica	NS	fase larval e adultos	intestino	-
Coleoptera	<i>Anthonomus grandis</i>	3 (<i>AgraNuc1</i> , <i>AgraNuc2</i> e <i>AgraNuc3</i>)	DNA/RNA endonuclease não específica	NS	<i>AgraNuc1</i> : adultos <i>AgraNuc2</i> e <i>AgraNuc3</i> : larvas e adultos	intestino médio	-
Coleoptera	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	2 (<i>Ld_dsRNase1</i> e <i>Ld_dsRNase2</i>)	DNA/RNA endonuclease não específica	NS	adultos	intestino	-
Coleoptera	<i>Cylas puncticollis</i>	3 (<i>CpdsRNase1</i> , <i>CpdsRNase3</i> e <i>CpdsRNase4</i>)	DNA/RNA endonuclease não específica	NS	-	<i>CpdsRNase1</i> e <i>CpdsRNase3</i> : intestino <i>CpdsRNase4</i> : tecido adiposo	-
Coleoptera	<i>Tribolium castaneum</i>	4 (<i>TcdsRNase1</i> , <i>TcdsRNase2</i> , <i>TcdsRNase3</i> e <i>TcdsRNase4</i>)	DNA/RNA endonuclease não específica	NS	-	<i>TcdsRNase1</i> e <i>TcdsRNase2</i> : intestino <i>TcdsRNase3</i> : careca <i>TcdsRNase4</i> : cabeça	-
Orthoptera	<i>Schistocerca gregaria</i>	4 (<i>SgdsRNase1</i> , <i>SgdsRNase2</i> , <i>SgdsRNase3</i> e <i>SgdsRNase4</i>)	DNA/RNA endonuclease não específica	NS	-	intestino	-
Orthoptera	<i>Locusta migratoria</i>	4 (<i>LmdsRNase1</i> , <i>LmdsRNase2</i> , <i>LmdsRNase3</i> e <i>LmdsRNase4</i>)	DNA/RNA endonuclease não específica	NS	<i>LmdsRNase1</i> e <i>LmdsRNase4</i> : estável durante os dias 1 a 8 de ninfas de 5º instar <i>LmdsRNase2</i> : dias 2 a 4 de ninfas de 5º instar <i>LmdsRNase3</i> : dia 8 de ninfas de 5º instar	<i>LmdsRNase2</i> e <i>LmdsRNase3</i> : intestino <i>LmdsRNase1</i> e <i>LmdsRNase4</i> : hemolinfa	-
Hemiptera	<i>Bemisia tabaci</i>	3 (<i>BidsRNase1</i> , <i>BidsRNase2</i> e <i>BidsRNase3</i>)	DNA/RNA endonuclease não específica	NS	-	<i>BidsRNase1</i> e <i>BidsRNase2</i> : intestino <i>BidsRNase3</i> : glândula salivar	-

Quando comparamos as sequências das dsRNases NUC encontradas comumente em insetos das classes Lepidoptera, Diptera, Hemiptera, Coleoptera e Orthoptera com as REases PIN identificadas originalmente em *O. furnacalis* e, posteriormente, em *H. armigera*, *O. nubilalis* e *D. saccharalis*, observamos que não há homologia entre elas (Figura 9). No entanto, apesar de pertencerem a famílias proteicas distintas, ambas parecem atuar na degradação de dsRNA, influenciando a eficiência RNAi nos insetos, como já foi demonstrado por inúmeros trabalhos (Peng *et al.*, 2020a, Song *et al.*, 2018, Yoon *et al.*, 2021, Guan *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2021, Cooper *et al.*, 2020, Chen *et al.*, 2021, Yao *et al.*, 2022, Li *et al.*, 2022). Entretanto, as REases da família do domínio PIN, parecem ser mais específicas, tanto no que diz respeito a substrato, quanto a processos celulares em que atuam e tecidos nos quais são expressas. Além disso, como sugerido por Guan *et al.* (2018), as REases seriam proteínas específicas de insetos da ordem Lepidoptera ao que se sabe até o momento. É possível que estes insetos tenham desenvolvido durante a evolução, mecanismos de defesa viral dentro os quais envolvem-se as REases, já que a maioria dos vírus de insetos conhecidos atacam lepidópteros e, em menor grau, dípteros, coleópteros, himenópteros, ortópteros e blatídeos, que apresentam níveis muito baixos de infecções virais (Swevers *et al.*, 2013).

É importante ressaltar a relevância desta proteína no contexto da redução da eficiência de RNAi em lepidópteros, estabelecendo-as como protagonistas na recalcitrância ao RNAi por ter sido descrita como uma classe de proteínas exclusiva de lepidópteros (Guan *et al.*, 2018). O fato de que em *O. nubilalis*, nenhum dos quatro genes *OndsRNases* foi significativamente regulado positivamente após a ingestão ou injeção de dsRNA em qualquer um dos pontos temporais investigados corrobora a importância de REases na recalcitrância ao RNAi. Não obstante, os níveis de transcrição de *OnREase* foram significativamente induzidos após a ingestão e injeção de dsRNA, aumentando a expressão em 4,7 vezes 6 h após tratamento com dsGFP em comparação ao controle (Cooper *et al.*, 2020).

Ainda assim, apesar de destacarmos a importância da descoberta da REase de *D. saccharalis* e sua potencial relação com a eficiência RNAi na espécie, sabendo da existência de mais de uma família de nucleases que degradam dsRNA, podemos hipotetizar a existência de outros genes do genoma de *D. saccharalis* os quais podem apresentar este domínio endonuclease NS, e que também possam estar relacionados com degradação de dsRNA neste inseto. Neste caso, cria-se uma perspectiva para identificar outras possíveis dsRNases na broca da cana-de-açúcar, buscando a compreensão mais ampla do papel e contribuição de cada uma dessas nucleases para recalcitrância ao RNAi não somente em *D. saccharalis*, mas na ordem Lepidoptera como um todo.

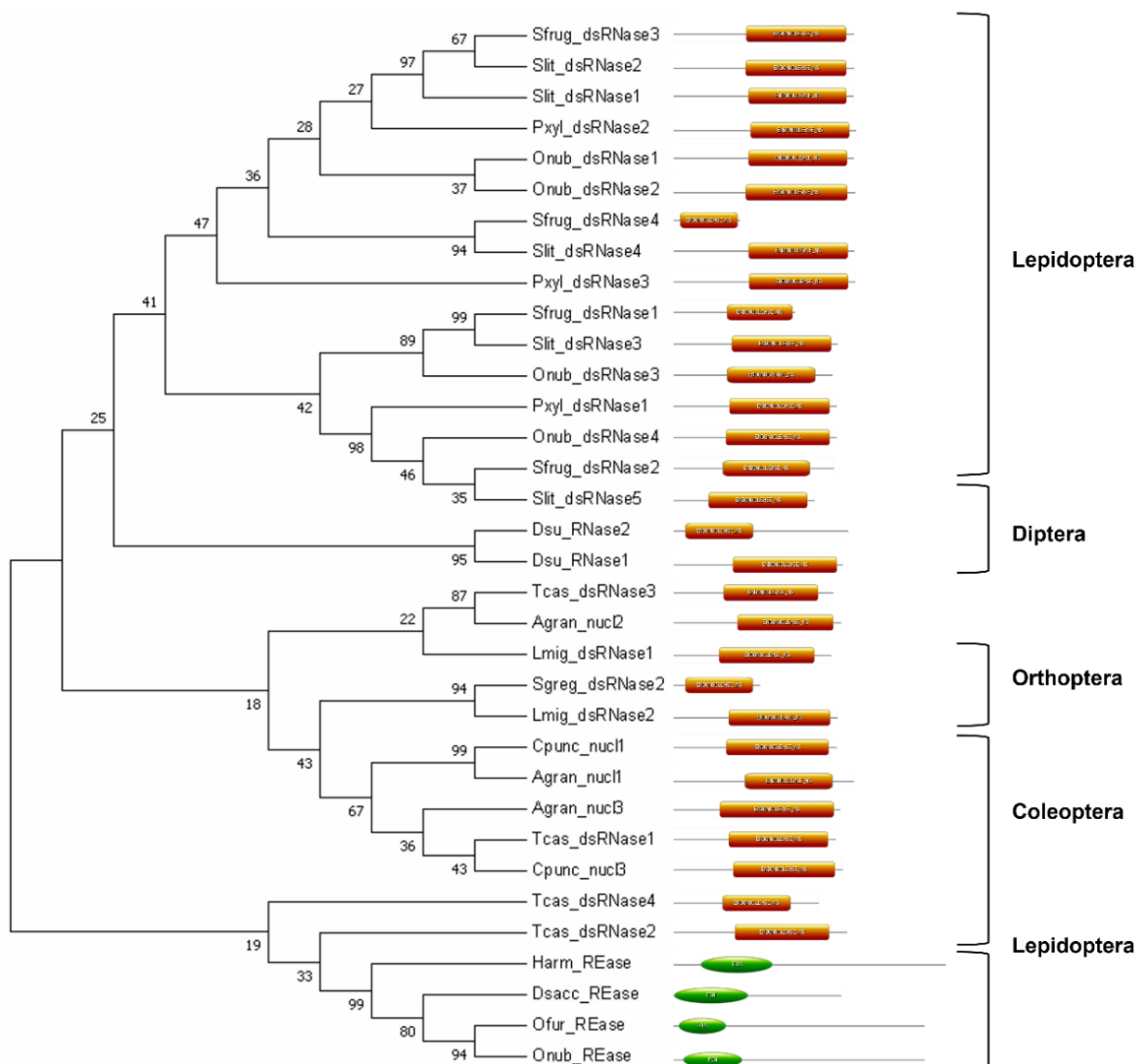


Figura 9. Árvore evolutiva de 34 nucleases (REases e dsRNases) de insetos de 13 espécies construída pelo método de vizinhança (1000 repetições). O domínio endonuclease NS está representado pela cor laranja e o domínio PIN, pela cor verde. O nome da espécie e o número de acesso do GenBank correspondente a cada sequência são os seguintes. Lepidoptera: Dsacc_REase, *Diatraea saccharalis*; Ofur_REase, *Ostrinia furnacalis* (AYE20402.1); Onub_REase, *Ostrinia nubilalis* (QOE54914.1); Harm_REase, *Helicoverpa armigera* (XP_021192733.2); Onub_dsRNase1, *O. nubilalis* (QOE54913.1); Onub_dsRNase2, *O. nubilalis* (QOE54910.1); Onub_dsRNase3, *O. nubilalis* (QOE54911.1); Onub_dsRNase4, *O. nubilalis* (QOE54912.1); Sfrug_dsRNase1, *Spodoptera frugiperda* (UPW35019.1); Sfrug_dsRNase2, *S. frugiperda* (UPW35018.1); Sfrug_dsRNase3, *S. frugiperda* (UPW35020.1); Sfrug_dsRNase4, *S. frugiperda* (UPW35098.1); Slit_dsRNase1, *Spodoptera litura* (QJD55608.1); Slit_dsRNase2, *S. litura* (QJD55609.1); Slit_dsRNase3, *S. litura* (QJD55610.1); Slit_dsRNase4, *S. litura* (QJD55611.1); Slit_dsRNase5, *S. litura* (QJD55612.1); Pxyl_dsRNase1, *Plutella xylostella* (QZW25237.1); Pxyl_dsRNase2, *P. xylostella* (QZW25238.1); Pxyl_dsRNase3, *P. xylostella* (QZW25239.1). Díptera: Dsuz_RNase1, *Drosophila suzukii* (QXY82428.1); Dsuz_RNase2, *D. suzukii* (QXY82429.1). Ortóptera: Sgreg_dsRNase2, *Schistocerca gregaria* (AHN55089.1); Lmig_dsRNase1, *Locusta migratoria* (ARW74134.1); Lmig_dsRNase2, *L. migratoria* (ARW74135.1). Coleoptera: Cpunc_nuc1, *Cylas puncticollis* (QCF41177.1); Cpunc_nuc3, *C. puncticollis* (AHN55089.1); Agran_nuc1, *Anthonomus grandis* (MK493024.1); Agran_nuc2, *A. grandis* (MK493025.1); Agran_nuc3, *A. grandis* (MK493026.1); Tcas_dsRNase1, *Tribolium castaneum* (QJD55726.1); Tcas_dsRNase2, *T. castaneum* (QJD55727.1); Tcas_dsRNase3, *T. castaneum* (QJD55728.1); Tcas_dsRNase4,

4.3.3. Análise de expressão do gene *Ds_up56* em lagartas de *D. saccharalis* após ingestão de *dsGFP* por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

O objetivo deste experimento foi verificar a ocorrência do aumento no nível de expressão do gene *Ds_up56* de *D. saccharalis* mediante a ingestão de moléculas de dsRNA expressas em *E. coli*. Para isto, *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA contra o gene *GFP* (*dsGFP*) foram fornecidas via dieta artificial a lagartas neonatas de *D. saccharalis*. As lagartas foram coletadas nos tempos de 2 h, 4 h, 6 h e 8 h após alimentação em dieta artificial contendo a suspensão bacteriana expressando dsRNA

Com a ingestão das moléculas de *dsGFP*, esperava-se que os níveis de expressão do gene *Ds_up56* aumentassem com o passar do tempo. A ingestão pelas lagartas da suspensão de bactérias coloridas e seu acúmulo ao longo das horas de coleta (2 h, 4 h, 6 h e 8 h) puderam ser comprovadas visualmente pela acentuação da coloração azul adicionado às bactérias fornecidas na dieta artificial da (Figura 10).

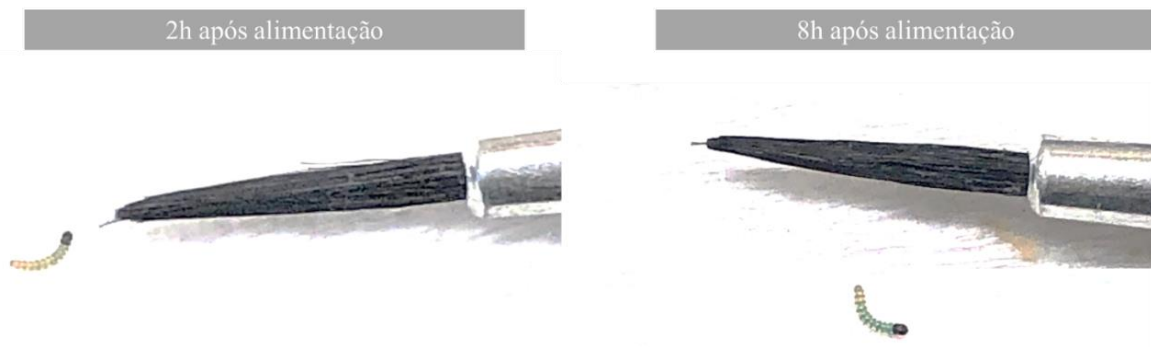


Figura 10. Análise da ingestão e acúmulo da bactéria *E. coli* HT115 (DE3) expressando *dsGFP* coloridas com corante azul alimentício no intestino da lagarta *Diatraea. saccharalis*. À esquerda, lagarta neonata alimentada em dieta artificial contendo bactérias expressando dsRNA após 2h de alimentação. À direita, a mesma lagarta após 8h de alimentação em dieta artificial contendo bactérias expressando dsRNA.

A expressão relativa do gene *Ds_up56* no período de 2 h após a ingestão das moléculas de dsRNA não resultou em um aumento significativo acúmulo de transcritos em relação aos tratamentos sem bactéria (controle negativo, contendo somente dieta artificial) e ao tratamento HT115 contendo o plasmídeo pL4440 vazio e dieta artificial (HT115 + pL4440) (Figura 11A). Contudo, nos tempos de 4 h, 6 h e 8 h após a ingestão de *dsGFP*, observou-se diferença na expressão em relação ao controle, verificando-se um acúmulo de transcritos de 5,75, 5,03 e 5,45 vezes em relação ao controle somente dieta, respectivamente (Figura 11B, C e D).

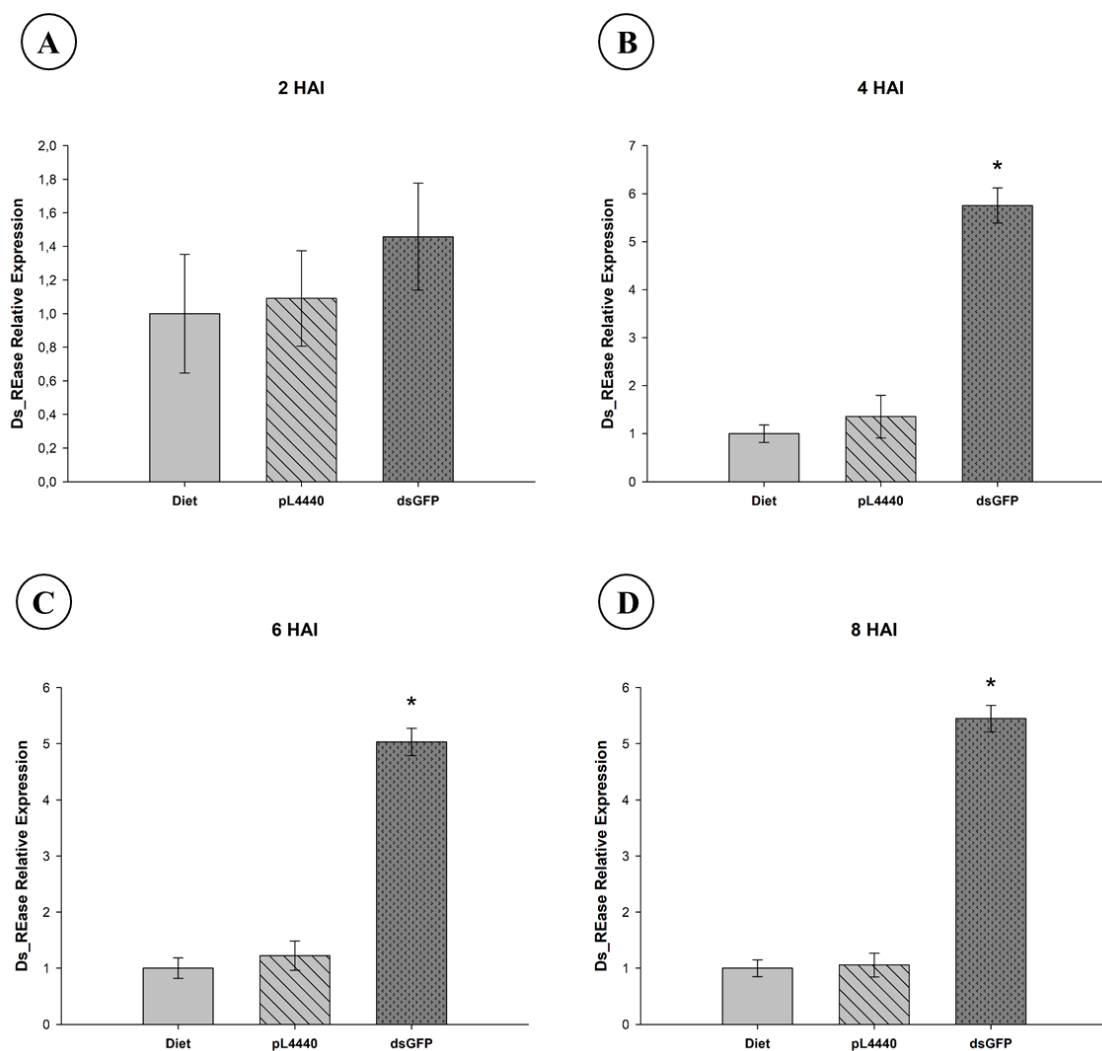


Figura 11. Expressão relativa do gene *Ds_up56*, que codifica a enzima REase de *Diatraea saccharalis*, após se alimentarem de dieta artificial, dieta artificial contendo bactérias *Escherichia coli* HT115 (DE3) transformadas com o vetor pL4440 vazio ou bactérias *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsGFP, nos períodos de 2 (A), 4 (B), 6 (C) e 8 (D) horas após a ingestão. A normalização dos dados foi realizada com base no tratamento dieta. O gene de referência foi o *ribosomal protein 19 (RPS19)* de *D. saccharalis*.

A REase de *O. furnacalis* é capaz de digerir o dsRNA antes mesmo do processamento pela *Dicer* e, por isso, seria tão eficiente em afetar a eficiência do RNAi (Guan *et al.*, 2018). Após 4 h da ingestão de moléculas de dsEGFP, as lagartas de *O. furnacalis* exibiram um maior nível de expressão de *up56*, em relação às lagartas controle (Guan *et al.*, 2018). Aqui, *Ds_up56* também demonstrou o mesmo padrão de indução de expressão gênica à exposição a moléculas de dsRNA (dsGFP) 4 h, 6 h e 8 h após a ingestão de dieta artificial contendo bactérias HT115 expressando dsGFP, com diferença significativa com relação ao tratamento controle, no acúmulo de transcritos de *Ds_up56*, com regulação positiva dos transcritos induzida por dsRNA.

Também realizamos a análise de expressão de *Ds_up56* em amostras coletadas em condições naturais de desenvolvimento sem a exposição a dsRNA. Neste caso, o nível de expressão do gene se manteve aparentemente constante e presente nos diversos estágios do inseto, sem diferenças significativas no padrão de expressão quando analisados como um todo (Figura 12). Em *H. armigera*, a análise de *HaREase* (família PIN) ao longo dos estágios de desenvolvimento do inseto demonstrou aumento progressivo com a evolução dos ínstaes, atingindo a maior fase de expressão do terceiro ao quinto instar (Guan *et al.*, 2019). Já em *O. nubilalis*, o padrão observado para expressão de REase ao longo do desenvolvimento do inseto foi similar ao obtido para *D. saccharalis*. A expressão de *OnREase* foi detectada em todos os estágios de desenvolvimento, desde ovo até adulto, sendo maior em larvas de terceiro e quarto instar e menor em ovos (Cooper *et al.*, 2020). Apesar de não existir um padrão na expressão destes genes de REases entre as espécies de insetos, na maioria dos insetos analisados até o momento, as nucleases de maneira geral, incluindo dsRNases e REases, são expressas preferencialmente durante os estágios de desenvolvimento larval (Yoon *et al.*, 2021). Além de larvas, também foram encontrados casos delas sendo expressas em adultos, mas nunca em estágios embrionários ou de pupa (Yoon *et al.*, 2022), o que sugere que essas nucleases protegem os organismos contra moléculas de RNA estranhas recebidas durante períodos em que os mesmos se alimentam.

Diante destes resultados, concluímos que o gene *Ds_up56* em *D. saccharalis* é regulado positivamente por exposição a presença de moléculas de dsRNA, corroborando a hipótese de que a função deste gene se relaciona com a eficiência RNAi no inseto. Ademais, os resultados apresentados nos possibilitam sugerir que identificamos um fator bastante relevante, possivelmente dentre outros, que explicam a baixa eficiência e recalcitrância RNAi na espécie *D. saccharalis*.

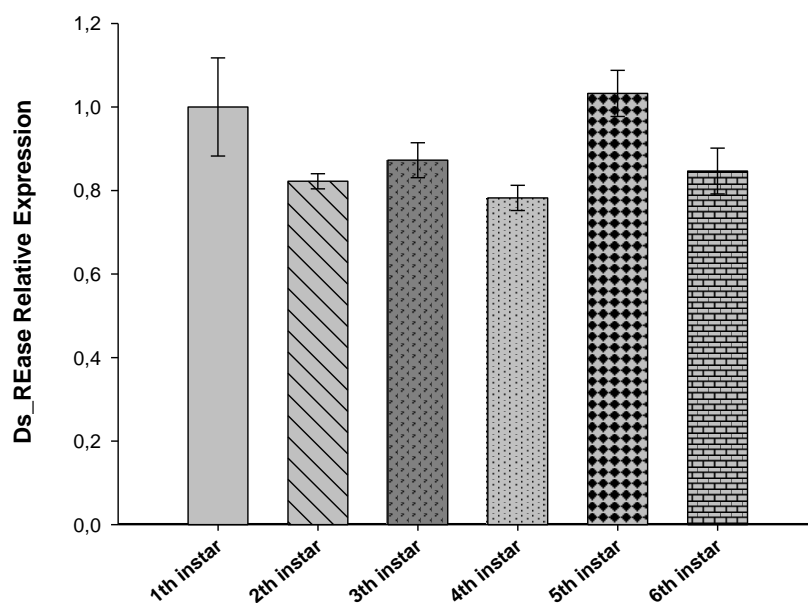


Figura 12. Expressão relativa do gene *Ds_up56*, que codifica a enzima REase de *Diatraea saccharalis*, ao longo dos diferentes ínstaes larvais (1° ao 6° instar larval). A normalização dos dados foi realizada com base no primeiro instar. O gene de referência foi o *ribossomal protein 19 (RPS19)* de *D. saccharalis*.

4.3.4. Obtenção de fragmento do gene *Ds_up56* para produção de dsRNA

A partir dos dados do transcriptoma de *D. saccharalis*, o transcrito parcial correspondente ao gene *Ds_up56* (“comp54701_c0_seq”), que codifica a enzima REase, foi utilizado como molde para o desenho de *primers*, permitindo à amplificação de um fragmento de 450 pb (tamanho menor em relação ao que já havia sido amplificado, de 1440 pb) para utilizá-lo para produção de dsRNA em bactérias. Desta amplificação, o fragmento do tamanho esperado foi purificado de gel de agarose e clonado em vetor pGEM-T *Easy*. Dois clones positivos do gene foram sequenciados e analisados por restrição para confirmação. A análise de restrição indicou que os clones selecionados apresentaram o padrão de bandas esperado e dois foram escolhidos para sequenciamento e apresentaram a identidade esperada (Figura 13).

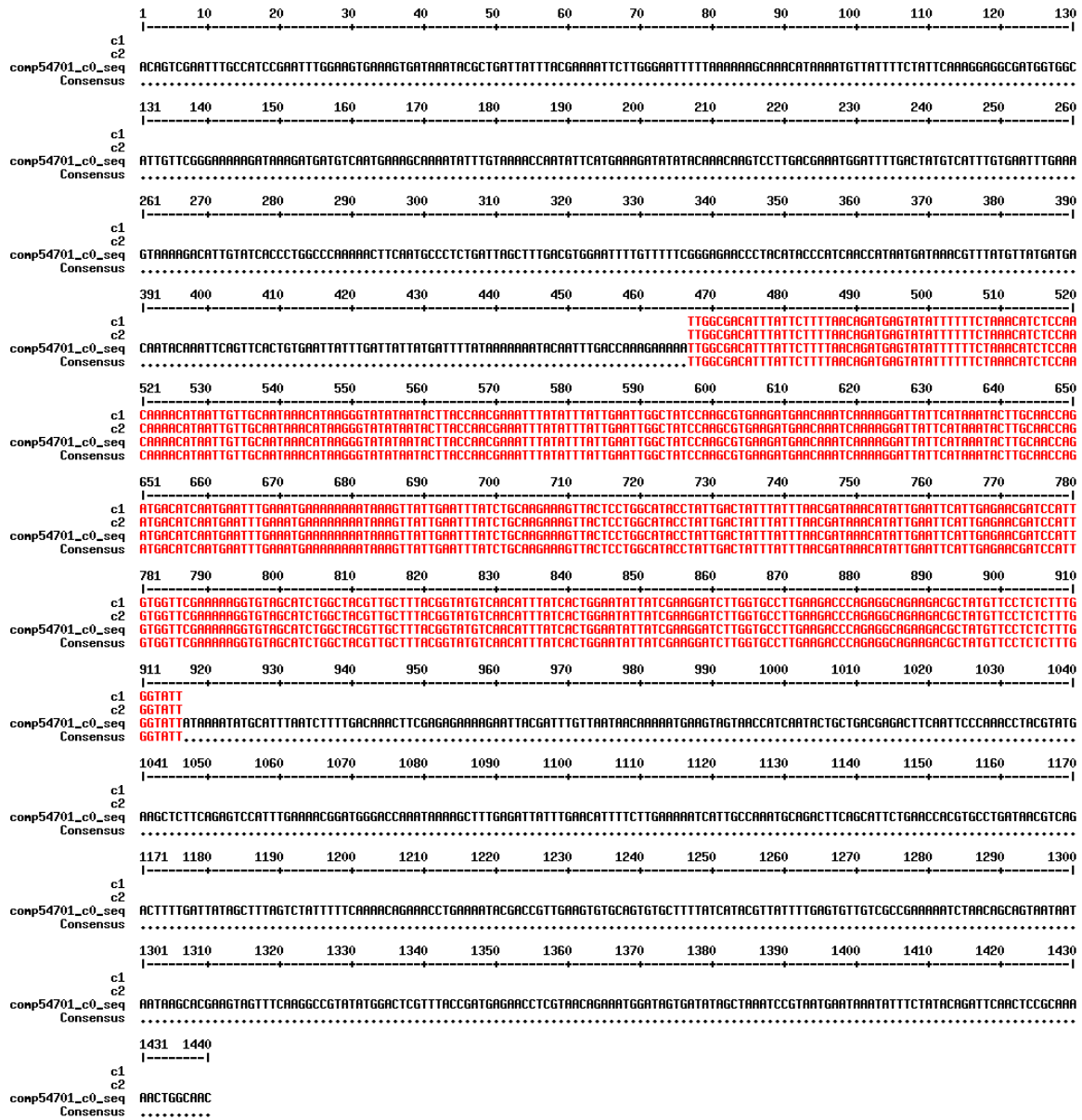


Figura 13. Alinhamento da sequência parcial do transcrito original do gene *up56* de *Diatraea saccharalis* (comp54701_c0_seq) com as sequências dos fragmentos gênicos menores (450 pb) de *Ds_up56* obtidos após clonagem em pGEM-T *Easy*. C1 e C2 correspondem às sequências dos clones transformados positivos.

O clone em pGEM-T *Easy* foi então subclonado no vetor de silenciamento pL4440. O produto obtido da digestão apresentou tamanho esperado de 450 pb e foi purificado. O fragmento recuperado foi então ligado ao vetor pL4440 linearizado e transformado em *E. coli* DH5 α . A confirmação dos clones positivos com a construção pL4440: *Ds_up56* foi feita por meio de digestão com *EcoRV*, e entre os clones apresentando os fragmentos com tamanho esperado pela análise de restrição (2676 pb e 554 pb), dois clones foram sequenciados (Figura 14). Os clones foram então utilizados para transformação de *E. coli* HT115 (DE3).

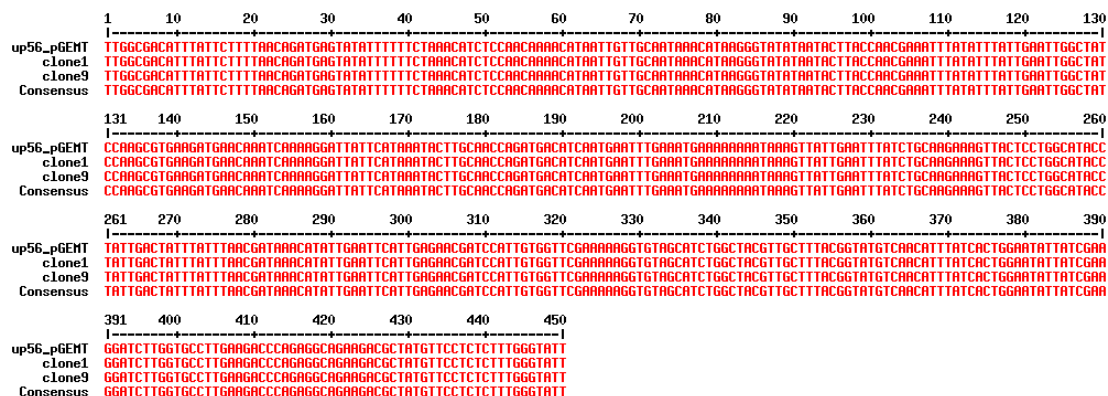


Figura 14. Alinhamento do fragmento resultante do sequenciamento do gene *up56* de *Diatraea saccharalis* obtido após minipreparação plasmidial de clones (clone1 e clone9) de *E. coli* DH5 α transformadas com a construção pL4440: *Ds_up56*.

A confirmação de clones de *E. coli* HT1115 (DE3) transformados com pL4440: *Ds_up56* foi feita por meio de digestão com *EcoRV* e sequenciamento. Dois clones foram sequenciados e confirmados (Figura 15). Estes clones foram então utilizados para o experimento de fornecimento de dsRNA contra o gene *Ds_up56* para lagartas de *D. saccharalis*.

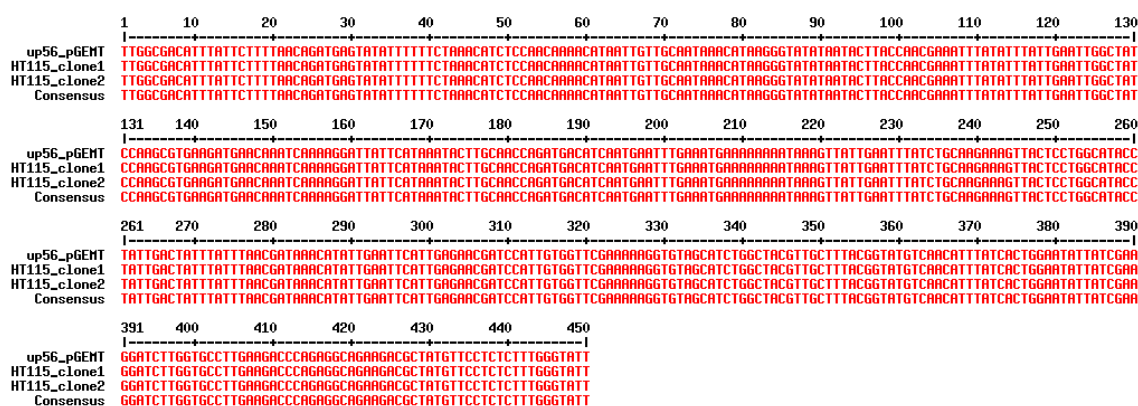


Figura 15. Alinhamento do fragmento resultante do sequenciamento do gene *up56* de *Diatraea saccharalis* obtido após minipreparação plasmidial de clones de *Escherichia coli* HT115 (DE3) transformadas com a construção pL4440: *Ds_up56*.

4.3.5. Influência do knockdown da REase de *D. saccharalis* na resposta RNAi do inseto

Foi realizado experimento com o fornecimento simultâneo de bactérias expressando dsRNA contra o gene-alvo do inseto *CHI* (ds*CHI*), e dsRNA contra *Ds_up56*, às lagartas de *D. saccharalis*. Foi possível observar que 6 h após a ingestão, as lagartas alimentadas no tratamento com ambos os dsRNAs contra *CHI* e contra *REase* apresentaram redução significativa na expressão do gene da *REase* e, principalmente, do gene-alvo *CHI* (Figura 16). No caso de *Ds_up56*, a redução no nível de transcritos foi de 6,6 vezes comparado ao controle

“dieta”, enquanto a redução nos transcritos de *CHI* foi de 3,5 vezes comparado ao controle “dieta” e ao tratamento somente com ds*CHI* (Figura 16). Ainda, foi possível observar que a exposição ao dsRNA do gene *CHI*, regulou positivamente o gene *Ds_up56*, aumentando seu nível de transcrição em 3,9 vezes comparado ao tratamento “dieta”, corroborando os dados obtidos com a exposição a dsGPF. Por outro lado, quando as larvas se alimentaram apenas de ds*CHI*, não houve silenciamento do gene-alvo de interesse (Figura 16). O mesmo foi observado em *O. furnacalis* (Guan *et al.*, 2018). Neste caso, em experimento similar, após tratamento duplo de RNAi com ds*REase* mais ds*KTI* ou ds*CTP8*, a diminuição da expressão de *REase* pode aumentar significativamente a eficiência de RNAi dos genes *KTI* e *CTP8*, comparando-se com aqueles tratamentos em que o inseto foi exposto apenas a ds*KTI* ou ds*CTP8*.

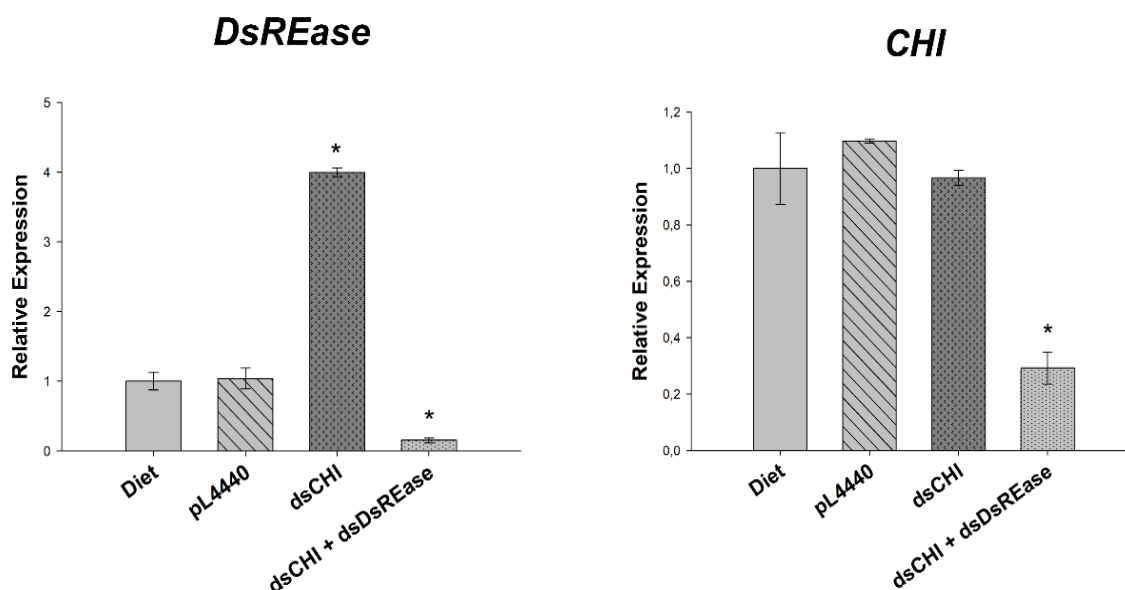


Figura 16. À esquerda, expressão relativa do gene *Ds_up56*, que codifica a enzima REase de *Diatraea saccharalis*, após 6 horas de alimentação das lagartas em a) dieta artificial, b) dieta contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) transformada com pL4440 (vetor vazio); c) dieta contendo *E. coli* HT115 (DE3) expressando ds*CHI* e; d) dieta contendo *E. coli* HT115 (DE3) expressando ds*CHI* e *E. coli* HT115 (DE3) expressando ds*Ds_up56*. À direita, expressão relativa do gene *CHI* de *D. saccharalis*, 6 h após a ingestão dos mesmos tratamentos descritos anteriormente em a, b, c e d.). A normalização dos dados foi realizada com base no tratamento dieta. O gene de referência foi o *RPS19* (ribossomal protein 19) de *D. saccharalis*.

Quando analisamos os parâmetros fenotípicos, buscando alterações relacionadas ao efeito do silenciamento gênico após as lagartas completarem seu ciclo biológico, observamos que para aquelas que se alimentaram somente de dieta artificial e de dieta artificial contendo ds*CHI*, a taxa de mortalidade larval foi de 0% (Figura 17). No tratamento correspondente à alimentação em dieta artificial contendo bactérias transformadas com vetor vazio (HT115/L4440), a taxa de mortalidade foi de 5,55%. Por fim, no tratamento no qual as

lagartas se alimentaram de dieta contendo bactérias expressando ambos os dsRNAs, contra os genes *CHI* e *Ds_up56*, a taxa de mortalidade foi de 11,11%. Houve aumento na mortalidade, mas diferenças de letalidade não foram significativas comparando-se os diferentes tratamentos (Figura 17).

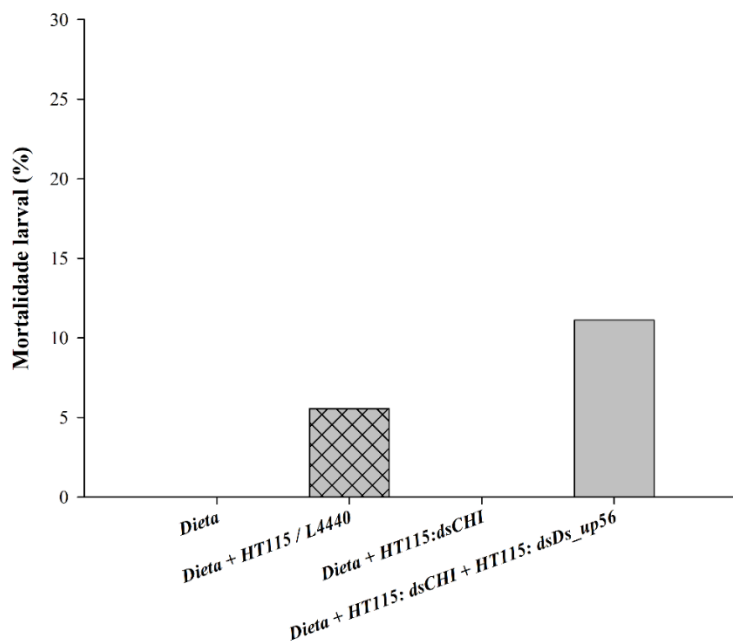


Figura 17. Porcentagem de mortalidade da fase larval de *Diatraea saccharalis* após as lagartas se alimentarem em dieta artificial; dieta contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) transformada com o vetor de silenciamento pL4440; dieta contendo *E. coli* HT115 (DE3) expressando ds*CHI* e; dieta contendo *E. coli* HT115 (DE3) expressando ds*CHI* e ds*Ds_up56*. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente p -valor = 0,1985 e $n=18$.

Para o parâmetro peso de pupas não foram observadas diferenças entre os tratamentos, tanto para pupas machos quanto para pupas fêmeas, (Figuras 18). Houve um aumento da duração do ciclo larval com diferenças estatísticas significativas tanto para fêmeas quanto para machos no tratamento em que as lagartas se alimentaram de dieta contendo bactérias expressando ambos os dsRNAs, ds*CHI* e ds*Ds_up56* em relação ao tratamento controle (somente dieta artificial) (Figura 19). Os resultados sugerem que o silenciamento do gene *CHI*, facilitado pelo *knockdown* da REase, apesar de não contribuir para a mortalidade do inseto, apresentou efeito significativo no desenvolvimento das larvas. Quando consideramos na função exercida pelo gene *CHI*, fica claro que a redução no nível de transcritos, provocada pelo silenciamento via RNAi no inseto, possivelmente dificultou seu desenvolvimento, retardando suas ecdises, dificultando a formação de novos exoesqueletos e, conseqüentemente, aumentando a duração do ciclo larval, ou ainda, retardando seu processo

de se tornar adulto e seguir seu ciclo de vida. Porém, não foram observadas alterações fenotípicas macroscópicas nas larvas.

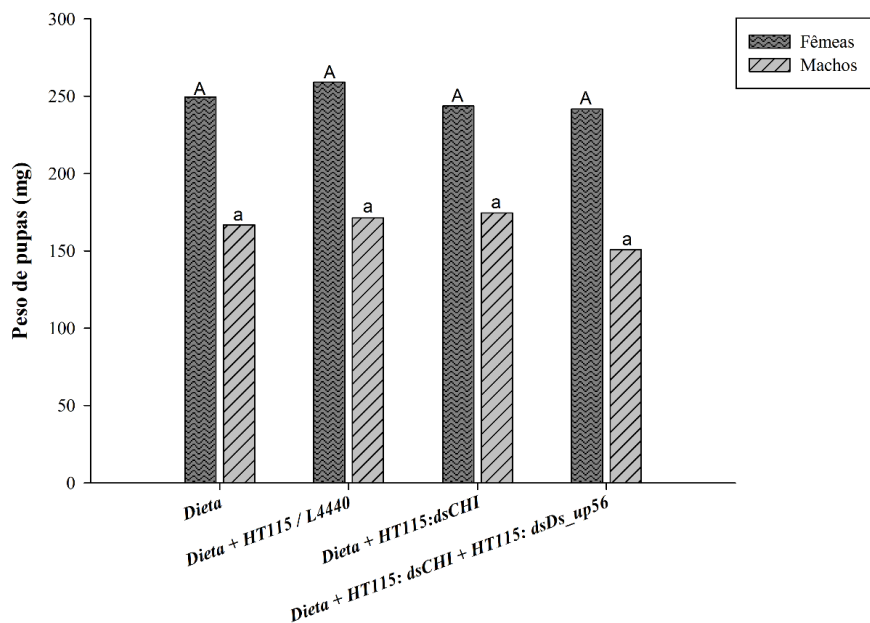


Figura 18. Peso de pupas fêmeas e machos de *Diatraea saccharalis*, em mg, após as lagartas se alimentarem em dieta artificial; dieta contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) transformada com o vetor de silenciamento pL4440; dieta contendo *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsCHI e; dieta contendo *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsCHI e dsDs_up56. Barras seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de comparação múltipla de médias ($p < 0,1$). Macho: $p=0,1549$; Fêmea: $p=0,4494$ e $n=18$.

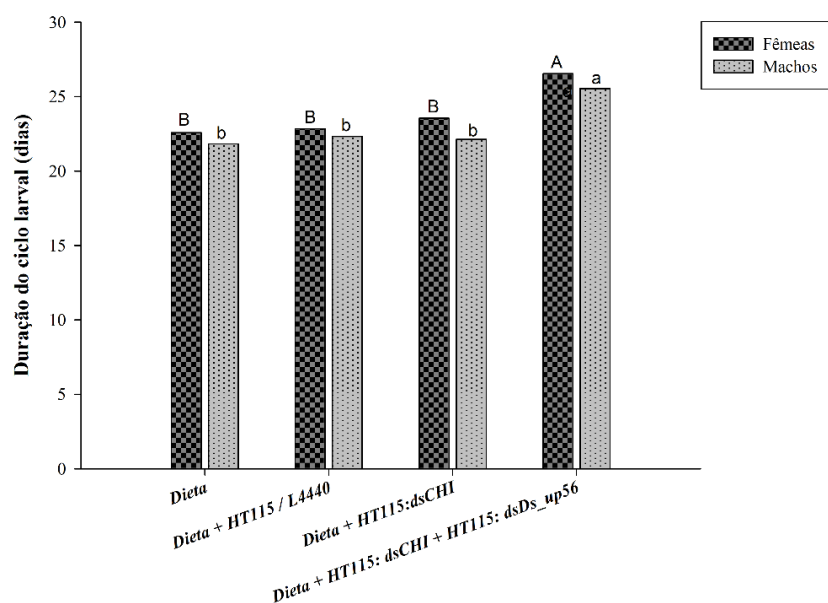


Figura 19. Duração do ciclo larval de fêmeas e machos de *Diatraea saccharalis* em dias após as lagartas se alimentarem em dieta artificial; dieta contendo *Escherichia coli* HT115 (DE3) transformada com o vetor de silenciamento pL4440; dieta contendo *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsCHI e; dieta contendo *E. coli* HT115 (DE3) expressando dsCHI e dsDs_up56. Barras seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de comparação múltipla de médias ($p < 0,1$). Macho: $p=2,63e^{-09}$ *; Fêmea: $p=1,899e^{-07}$ *.

Com isso, pudemos demonstrar que o gene *Ds_up56* que identificamos, possivelmente está ligado à eficiência do RNAi em *D. saccharalis*. O *knockdown* do gene *Ds_up56* aumentou a eficiência de silenciamento RNAi em *D. saccharalis*, contribuindo com a redução no acúmulo dos transcritos do gene-alvo *CHI*, afetando a duração do ciclo larval das fêmeas. A ausência de diferenças significativas para alguns parâmetros biológicos pode derivar do efeito menor do gene alvo escolhido para silenciamento ou pode derivar do número limitado de replicatas.

A estratégia do uso de *knockdown* de nucleases para aumentar a eficiência RNAi já foi utilizada e demonstrou sucesso em diversos insetos, principalmente da ordem Lepidoptera. Em *O. furnacalis*, um experimento de RNAi duplo foi realizado, injetando *dsREase* mais *dsKTI* ou *dsCTP8* em lagartas de quinto instar (Guan *et al.*, 2018). Os resultados mostraram que diminuir a expressão de *REase* aumentou significativamente a eficiência de RNAi dos genes *KTI* e *CTP8*. Em *S. frugiperda*, dsRNAs direcionados a quatro *sfdsRNases* foram sintetizados, encapsulados em lipídeos e injetados em larvas de quarto instar (Yao *et al.*, 2022). Com isso, a expressão dos quatro genes *sfdsRNase* foi significativamente diminuída em comparação ao controle. Em seguida, o suco do intestino médio e a hemolinfa foram dissecados desses insetos cujo silenciamento foi bem-sucedido e incubados com *dsEGFP* (Yao *et al.*, 2022). Após 60 min, a concentração relativa de *dsEGFP* foi significativamente maior no grupo cujas *sfdsRNases* sofreram *knockdown* do que no grupo controle (Yao *et al.*, 2022). Uma situação semelhante foi detectada na hemolinfa, já que a proporção de *dsEGFP* dos grupos de tratamento com *sfdsRNase1* e *sfdsRNase3* silenciadas foi muito maior do que em outros grupos após 60 min de incubação. Os resultados sugeriram que todas quatro *sfdsRNases* participaram da degradação exógena de dsRNA e que o silenciamento delas resultou na menor degradação de *dsEGFP* (Yao *et al.*, 2022).

Em *Hyphantria cunea* (Lepidoptera), usando o gene *chitinase 5* (*Cht5*) como gene-alvo, demonstrou-se que silenciar genes que codificam dsRNases (especialmente *HcdsRNase3* e *HcdsRNase4*) aumenta significativamente a eficácia de RNAi via injeção de *dsHcCht5*, e co-silenciar esses dois genes *HcdsRNases* resultam em uma melhora ainda mais significativa na eficácia (Zhang *et al.*, 2022). Também, em *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera), o co-silenciamento de *CmCHS* (quitina sintase de *C. medinalis*) e *CmdsRNase* afetou significativamente o crescimento e desenvolvimento do inseto e, assim, melhorou a eficácia do RNAi (Li *et al.*, 2022). As moléculas de dsRNAs de *CmdsRNase* e *CmCHS* foram injetadas em conjunto nas larvas de terceiro instar e o nível de expressão de *CmCHS* no tratamento de co-injeção de *dsCmdsRNase* + *dsCmCHS* foi significativamente menor do que

no de *dsCmCHS* sozinho. Três dias após a co-injeção de *dsCmRNase* + *dsCmCHS*, a eficiência de RNAi de *CmCHS* em *C. medinalis* aumentou em 22% e a mortalidade das larvas foi 1,5 vezes maior do que as larvas injetadas somente com *dsCmCHS* (Li *et al.*, 2022).

Portanto, a estratégia de silenciar nucleases pode contribuir para o aumento da eficiência RNAi de diversos lepidópteros, com taxas de melhoria de 27,2% e 22% muito similares ao que encontramos para *D. saccharalis* (aumento da eficiência de 27%). No entanto, é necessário ressaltar que estes trabalhos de *knockdown* de nucleases para aumento da eficiência RNAi, utilizam injeção como forma de entrega de dsRNA. Este método parece ser mais eficiente do ponto de vista de silenciamento gênico em lepidópteros, visto que se esquivam de algumas barreiras como degradação das moléculas de dsRNA pelo pH alcalino do trato digestório dos insetos, ou ainda, o aprisionamento das moléculas de dsRNA nos endossomos. Em contrapartida, a injeção é mais utilizada em estudos funcionais de pequena escala, não sendo plausível para ser aplicado no campo para proteção das plantas via RNAi. Para este fim, o método mais comumente utilizado é o da alimentação, com a entrega oral de dsRNA aos insetos. Por esse motivo, optamos por utilizá-lo neste trabalho com *D. saccharalis*, mesmo sabendo que é possível que fatores como degradação das moléculas de dsRNA pelo pH alcalino do intestino e aprisionamento endossomal das moléculas de dsRNA possam ter influenciado no menor *knockdown* da REase e menor entrega de *dsCHI*.

A estratégia de entregar dsRNA contra gene alvo por meio da ingestão após silenciar dsRNases foi utilizada em *S. litura* (Peng *et al.*, 2021). Após o *knockdown* de dois genes dsRNases específicos do intestino, via CRISPR/Cas9, as larvas alimentadas com dsRNA contra o gene P450 *CYP6AB14* (*CYP*) apresentaram uma diminuição de 23,2% nos níveis de mRNA de *CYP* (Peng *et al.*, 2021), em comparação a ausência de redução de transcritos no grupo controle, demonstrando que, o silenciamento de duas dsRNases no inseto contribuíram para maior eficiência de RNAi no inseto diante da alimentação de dsRNA contra o gene-alvo.

Outro aspecto relevante é que, diferentemente da maioria destas espécies de lepidópteros citadas, em *D. saccharalis* foi identificado até o momento somente um gene que codifica nuclease relacionada à eficiência RNAi, o *Ds_up56*. Provavelmente, a maior ou menor resposta ao mecanismo de silenciamento por RNA interferente depende do número de genes nucleases em uma espécie de inseto, sendo que a produção de múltiplas ribonucleases ocasionaria uma maior recalcitrância (Peng *et al.*, 2020b). Assim, demonstramos que o *knockdown* de *Ds_up56* ocasionou maior eficiência no silenciamento gênico de *CHI*, com diminuição dos transcritos do gene e alteração na duração do ciclo larval deste inseto, é provável que a descoberta e o silenciamento de genes que codificam dsRNases na espécie,

levar a uma eficiência ainda maior de RNAi, contribuindo para uma redução ainda mais significativa dos transcritos de demais genes-alvos, bem como para ocorrência de mortalidade significativa, contribuindo para o controle mais efetivo de *D. saccharalis* via RNAi.

A estratégia “*RNAi-of-RNAi*” tem sido implementada em insetos de outras ordens. Em Coleoptera, a remoção da atividade de nucleases em adultos de *Leptinotarsa decemlineata* aumentou a sensibilidade ao dsRNA e resultou em melhor proteção das plantas de batata (Spit *et al.*, 2017). A redução nos transcritos da nuclease influenciou positivamente o *knockdown* dos genes marcadores. (Spit *et al.*, 2017). O silenciamento de dsRNases (*Cp-dsRNase-1*, *Cp-dsRNase-3* e *Cp-dsRNase-4*) em larvas de *Cylas puncticollis* também pôde potencializar os efeitos do RNAi (Prentice *et al.*, 2019). As larvas foram primeiramente injetadas com dsRNA visando o *knockdown* dessas nucleases e, após 4 dias, foram transferidas para dieta artificial contendo ds*Snf7*. A análise de expressão gênica demonstrou que no tratamento ds*dsRN3* + ds*Snf7*, os níveis dos transcritos de *Cp-dsRNase-3* foram significativamente reduzidos em 82% no dia 1, havendo também um silenciamento significativo no gene *CpSnf7* (27%) (Prentice *et al.*, 2019). Já em *T. castaneum*, a fim de avaliar a influência de *TcdsRNase1* na eficiência da resposta de RNAi, primeiramente, *TcdsRNase1* foi silenciado pela injeção de ds*TcdsRNase1* e, em seguida, dsRNAs direcionando a genes marcadores (*TcLac2A* e *TcCYP6BK13*) foram introduzidos por injeção ou alimentação (Peng *et al.*, 2020a). Para a resposta de injeção de RNAi, houve um acréscimo na diminuição dos transcritos de *TcLac2a* e *TcCYP6BK13* de 58,9% e 46,1%, respectivamente, após o *knockdown* de *TcdsRNase1* (Peng *et al.*, 2020a). Após o ensaio de ingestão com regulação negativa da atividade de degradação do dsRNA, a eficiência do RNAi aumentou em 53,9% e 20,9% para *TcLac2a* e *TcCYP6BK13*, respectivamente (Peng *et al.*, 2020a). Esta mesma abordagem de coentrega utilizando primeiramente injeção de dsRNA para *knockdown* dos genes de dsRNases, seguido da administração oral / alimentação de dsRNAs contra genes-específicos, foi utilizada para o bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Coleoptera) (Garcia *et al.*, 2017). A microinjeção de ds*AgraNuc2* e dois dias após, a administração oral de ds*AgraChSII* resultou em um silenciamento do gene *AgraChSII* aproximadamente três vezes maior após a administração oral de ds*AgraChSI* em insetos nos quais *AgraNucs* foi silenciado. Além disso, a mortalidade foi 15% maior nos insetos com as nucleases e *ChSII* silenciados em comparação com os insetos com e somente *ChSII* silenciada (Garcia *et al.*, 2017). A oviposição também diminuiu em 50% em insetos com *knockdown* de nucleases e *ChSII*, quando comparada à oviposição dos insetos controle (Garcia *et al.*, 2017).

No caso de Diptera, moscas adultas de *Bactrocera tryoni*, foram alimentadas primeiro

com uma mistura de dois dsRNAs específicos de dsRNase1 e dsRNase2 por 3 dias, seguidos por 3 dias de alimentação com dsRNA contra o gene *yellow* (Tayler *et al.*, 2019). No dia 6, os níveis de transcrição de *dsRNase1* e *dsRNase2* foram reduzidos em 70% e 64% e os transcritos *yellow* foram reduzidos em 80% em relação ao controle. No mosquito *Aedes aegypti*, quando dsRNAs específicos de dsRNase foram coentregues com dsRNA direcionado a um gene repórter de proteína fluorescente ciano (*CFP*), utilizando um método de entrega bastante similar ao que utilizamos neste trabalho, ou seja, via alimentação (RNAi mediado por bactérias), foi observado um maior *knockdown* de *CFP* (Giesbrecht *et al.*, 2020).

Em Hemiptera, após ninfas de *Nezara viridula* terem sido injetadas com ds*NvdsRNase* e alimentadas com uma dieta contendo *ds α Cop*, as mesmas apresentaram uma mortalidade média de 65%, que foi significativamente diferente dos controles (18,33% a 46,67%) (Sharma *et al.*, 2021). A expressão de *NvdsRNase* apresentou uma redução de 98% nos transcritos e a expressão de *α Cop* de 48%, diferindo significativamente dos controles (Sharma *et al.*, 2021). Assim, o estudo demonstrou que o bloqueio da síntese de nucleases de dsRNA aumenta significativamente o silenciamento e a taxa de mortalidade no percevejo por interferência de RNAi.

Todos esses estudos de nocaute de nucleases, em sua maioria dsRNases da superfamília NUC, utilizando sistemas denominados como co-silenciamento, “*knockdown-to-knockdown*” ou “*RNAi-of-RNAi*”, independentemente do número de genes de dsRNases que o inseto possui ou métodos de entrega de dsRNA empregados, demonstraram claramente a grande contribuição dessas enzimas para degradação de dsRNA. Por conseguinte, esta estratégia *RNAi-of-RNAi*, com o silenciamento simultâneo de nucleases e gene-alvo essencial do inseto, revela-se bastante promissora para o futuro do controle de insetos-praga via RNAi.

4.4. Conclusões

Neste capítulo identificamos e caracterizamos REase de *Diatraea saccharalis*, codificada pelo gene *Ds_up56*, que pertence a uma família de proteínas caracterizadas por conter um domínio PIN no terminal amino, com atividade nuclease. Foi demonstrado que após a ingestão de *dsGFP*, e também quando tratado com *dsCHI*, houve um acúmulo de transcritos do gene *Ds_up56*, sugerindo que o gene é induzido quando exposto a dsRNAs. Por outro lado, o nível de expressão basal de *Ds_up56* se manteve constante nos diversos estágios do inseto inteiro, sem diferenças significativas no padrão de expressão quando não exposto a tratamento de dsRNA. Portanto, a regulação deste gene em *D. saccharalis* está relacionada à exposição a moléculas de dsRNA expressas nas bactérias e não pela exposição as bactérias

apenas, corroborando com a hipótese de que a função deste gene poderia estar relacionada com a eficiência RNAi no inseto. Por fim, demonstramos que o silenciamento desta nuclease, utilizando a estratégia de co-silenciamento, contribui significativamente para a maior redução no nível de transcritos do gene-lavo do inseto (*CHI*). Posto isto, já que demonstramos a existência de uma nuclease que influencia a eficiência RNAi em *D. saccharalis*, podemos dizer que, no geral, os resultados fornecem indicações do envolvimento de nucleases no processo de RNAi e como utilizar o mecanismo de interferência para o controle da broca da cana-de-açúcar e de outros lepidópteros no futuro.

Referências

- Allen, M. L., & Walker III, W. B. (2012). Saliva of *Lygus lineolaris* digests double stranded ribonucleic acids. *Journal of Insect Physiology*, 58, 391-396.
- Arcus, V. L., McKenzie, J. L., Robson, J., & Cook, G. M. (2010). The PIN-domain ribonucleases and the prokaryotic VapBC toxin-antitoxin array. *Protein Engineering, Design & Selection*, 24, 33-40.
- Arimatsu, Y., Kotani, E., Sugimura, Y., & Furusawa, T. (2007). Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 176-183.
- Baker, K. E., & Parker, R. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Current opinion in cell biology*, 16, 293-299.
- Baum, J. A., & Roberts, J. K. (2014). Progress towards RNAi-mediated insect pest management. In *Advances in insect physiology* (Vol. 47, pp. 249-295). Academic Press.
- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., ... & Roberts, J. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25, 1322-1326.
- Burand, J. P., & Hunter, W. B. (2013). RNAi: future in insect management. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, S68-S74.
- Cagliari, D., Dias, N. P., Galdeano, D. M., Dos Santos, E. Á., Smagghe, G., & Zotti, M. J. (2019). Management of pest insects and plant diseases by non-transformative RNAi. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1319.
- Carmell, M. A., & Hannon, G. J. (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11, 214-218.
- Castellanos, N. L., Smagghe, G., Sharma, R., Oliveira, E. E., & Christiaens, O. (2019). Liposome encapsulation and EDTA formulation of dsRNA targeting essential genes increase oral RNAi-caused mortality in the Neotropical stink bug *Euschistus heros*. *Pest Management Science*, 75, 537-548.
- Chen, J. Z., Jiang, Y. X., Li, M. W., Li, J. W., Zha, B. H., & Yang, G. (2021). Double-stranded RNA-degrading enzymes reduce the efficiency of RNA interference in *Plutella xylostella*. *Insects*, 12, 712.
- Christiaens, O., Whyard, S., Vélez, A. M., & Smagghe, G. (2020). Double-stranded RNA technology to control insect pests: Current status and challenges. *Frontiers in Plant Science*, 11, 451.
- Clissold, P. M., & Ponting, C. P. (2000). PIN domains in nonsense-mediated mRNA decay and RNAi. *Current Biology*, 10, R888-R890.

- Cooper, A. M., Silver, K., Zhang, J., Park, Y., & Zhu, K. Y. (2019). Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest Management Science*, 75, 18-28.
- Cooper, A. M., Song, H., Shi, X., Yu, Z., Lorenzen, M., Silver, K., ... & Zhu, K. Y. (2020). Molecular characterizations of double-stranded RNA degrading nuclease genes from *Ostrinia nubilalis*. *Insects*, 11, 652.
- Domeier, M. E., Morse, D. P., Knight, S. W., Portereiko, M., Bass, B. L., & Mango, S. E. (2000). A link between RNA interference and nonsense-mediated decay in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 289, 1928-1930.
- Dubelman, S., Fischer, J., Zapata, F., Huizinga, K., Jiang, C., Uffman, J., ... & Carson, D. (2014). Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. *PloS One*, 9, e93155.
- Fan, Y. H., Song, H. F., Abbas, M., Wang, Y. L., Li, T., Ma, E. B., ... & Zhang, J. Z. (2021). A dsRNA-degrading nuclease (dsRNase2) limits RNAi efficiency in the Asian corn borer (*Ostrinia furnacalis*). *Insect Science*, 28, 1677-1689.
- Gammon, D. B., & Mello, C. C. (2015). RNA interference-mediated antiviral defense in insects. *Current Opinion in Insect Science*, 8, 111-120.
- Garbutt, J. S., Bellés, X., Richards, E. H., & Reynolds, S. E. (2013). Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*. *Journal of Insect Physiology*, 59, 171-178.
- Garcia, R. A., Macedo, L. L. P., do Nascimento, D. C., Gillet, F. X., Moreira-Pinto, C. E., Faheem, M., ... & Grossi-de-Sa, M. F. (2017). Nucleases as a barrier to gene silencing in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. *PLoS One*, 12, e0189600.
- Giesbrecht, D., Heschuk, D., Wiens, I., Boguski, D., LaChance, P., & Whyard, S. (2020). RNA interference is enhanced by knockdown of double-stranded RNases in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Insects*, 11, 327.
- Glavan, F., Behm-Ansmant, I., Izaurralde, E., & Conti, E. (2006). Structures of the PIN domains of SMG6 and SMG5 reveal a nuclease within the mRNA surveillance complex. *The EMBO journal*, 25, 5117-5125
- Grover, S., Jindal, V., Banta, G., Taning, C. N. T., Smagghe, G., & Christiaens, O. (2019). Potential of RNA interference in the study and management of the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 100, e21522.
- Guan, R. B., Li, H. C., Fan, Y. J., Hu, S. R., Christiaens, O., Smagghe, G., & Miao, X. X. (2018). A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 6011-6021.
- Guan, R., Chen, Q., Li, H., Hu, S., Miao, X., Wang, G., & Yang, B. (2019). Knockout of the HaREase gene improves the stability of dsRNA and increases the sensitivity of *Helicoverpa armigera* to *Bacillus thuringiensis* toxin. *Frontiers in Physiology*, 10, 1368.
- Guo, W. C., Fu, K. Y., Yang, S., Li, X. X., & Li, G. Q. (2015). Instar-dependent systemic RNA interference response in *Leptinotarsa decemlineata* larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 123, 64-73.
- Gurusamy, D., Howell, J. L., Chereddy, S. C., Mogilicherla, K., & Palli, S. R. (2021). Improving RNA interference in the southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Journal of Pest Science*, 94, 1461-1472.
- Hensley, S. D., & Hammond Jr, A. M. (1968). Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *Journal of Economic Entomology*, 61(6), 1742-1743.
- Huvenne, H., & Smagghe, G. (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of Insect Physiology*, 56, 227-235.

- Ivashuta, S., Zhang, Y., Wiggins, B. E., Ramaseshadri, P., Segers, G. C., Johnson, S., ... & Heck, G. R. (2015). Environmental RNAi in herbivorous insects. *RNA*, 21, 840-850.
- Joga, M. R., Zotti, M. J., Smagghe, G., & Christiaens, O. (2016). RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. *Frontiers in Physiology*, 7, 553.
- Lamanna, A. C., & Karbstein, K. (2009). Nob1 binds the single-stranded cleavage site D at the 3'-end of 18S rRNA with its PIN domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 14259-14264.
- Li, J., Du, J., Li, S., & Wang, X. (2022). Identification and Characterization of a Double-Stranded RNA Degrading Nuclease Influencing RNAi Efficiency in the Rice Leaf Folder *Cnaphalocrocis medinalis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 3961.
- Li, X., Zhang, M., & Zhang, H. (2011). RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PloS One*, 6, e17788.
- Lingel, A., & Sattler, M. (2005). Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway. *Current Opinion in Structural Biology*, 15, 107-115.
- Liu, J., Swevers, L., Iatrou, K., Huvenne, H., & Smagghe, G. (2012). *Bombyx mori* DNA/RNA non-specific nuclease: expression of isoforms in insect culture cells, subcellular localization and functional assays. *Journal of Insect Physiology*, 58, 1166-1176.
- Lomate, P. R., & Bonning, B. C. (2016). Distinct properties of proteases and nucleases in the gut, salivary gland and saliva of southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Scientific Reports*, 6, 1-10.
- Luo, Y., Chen, Q., Luan, J., Chung, S. H., Van Eck, J., Turgeon, R., & Douglas, A. E. (2017). Towards an understanding of the molecular basis of effective RNAi against a global insect pest, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 88, 21-29.
- Marti, T. M., & Fleck, O. (2004). DNA repair nucleases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61, 336-354.
- Mogilicherla, K., Howell, J. L., & Palli, S. R. (2018). Improving RNAi in the Brown Marmorated Stink Bug: Identification of target genes and reference genes for RT-qPCR. *Scientific Reports*, 8, 1-9.
- Page, M. F., Carr, B., Anders, K. R., Grimson, A., & Anderson, P. (1999). SMG-2 is a phosphorylated protein required for mRNA surveillance in *Caenorhabditis elegans* and related to Upf1p of yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 5943-5951.
- Parker, R., & Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11, 121-127.
- Peng, Y., Wang, K., Chen, J., Wang, J., Zhang, H., Ze, L., ... & Han, Z. (2020a). Identification of a double-stranded RNA-degrading nuclease influencing both ingestion and injection RNA interference efficiency in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 125, 103440.
- Peng, Y., Wang, K., Fu, W., Sheng, C., & Han, Z. (2018). Biochemical comparison of dsRNA degrading nucleases in four different insects. *Frontiers in Physiology*, 9, 624.
- Peng, Y., Wang, K., Zhu, G., Han, Q., Chen, J., Elzaki, M. E. A., ... & Han, Z. (2020b). Identification and characterization of multiple dsRNases from a lepidopteran insect, the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 162, 86-95.
- Peng, Y., Zhu, G. H., Wang, K., Chen, J., Liu, X., Wu, M., ... & Han, Z. (2021). Knockout of SldsRNase1 and SldsRNase2 revealed their function in dsRNA degradation and contribution to RNAi efficiency in the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. *Journal of Pest Science*, 94, 1449-1460.

- Pereira, A. E., Carneiro, N. P., & Siegfried, B. D. (2016). Comparative susceptibility of southern and western corn rootworm adults and larvae to vATPase-A and Snf7 dsRNAs. *Journal of RNAi Gene Silencing*, 12, 528-535.
- Powell, M. E., Bradish, H. M., Gatehouse, J. A., & Fitches, E. C. (2017). Systemic RNAi in the small hive beetle *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae), a serious pest of the European honeybee *Apis mellifera*. *Pest Management Science*, 73, 53-63.
- Prentice, K., Smagghe, G., Gheysen, G., & Christiaens, O. (2019). Nuclease activity decreases the RNAi response in the sweetpotato weevil *Cylas puncticollis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 110, 80-89.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2017.
- Rangarajan, E. S., & Shankar, V. (2001). Sugar non-specific endonucleases. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 583-613.
- Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols* (pp. 365-386). Humana Press, Totowa, NJ.
- San Miguel, K., & Scott, J. G. (2016). The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. *Pest Management Science*, 72, 801-809.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3, 1101-1108.
- Sharma, R., Taning, C. N. T., Smagghe, G., & Christiaens, O. (2021). Silencing of double-stranded ribonuclease improves oral RNAi efficacy in southern green stinkbug *Nezara viridula*. *Insects*, 12, 115.
- Shukla, J. N., Kalsi, M., Sethi, A., Narva, K. E., Fishilevich, E., Singh, S., ... & Palli, S. R. (2016). Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. *RNA Biology*, 13, 656-669.
- Silver, K., Cooper, A. M., & Zhu, K. Y. (2021). Strategies for enhancing the efficiency of RNA interference in insects. *Pest Management Science*, 77, 2645-2658.
- Singh, I. K., Singh, S., Mogilicherla, K., Shukla, J. N., & Palli, S. R. (2017). Comparative analysis of double-stranded RNA degradation and processing in insects. *Scientific Reports*, 7, 1-12.
- Song, H., Fan, Y., Zhang, J., Cooper, A. M., Silver, K., Li, D., ... & Zhang, J. (2018). Contributions of dsRNases to differential RNAi efficiencies between the injection and oral delivery of dsRNA in *Locusta migratoria*. *Pest Management Science*, 75, 1707-1717.
- Song, H., Zhang, J., Li, D., Cooper, A. M., Silver, K., Li, T., ... & Zhang, J. (2017). A double-stranded RNA degrading enzyme reduces the efficiency of oral RNA interference in migratory locust. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 86, 68-80.
- Spit, J., Philips, A., Wynant, N., Santos, D., Plaetinck, G., & Broeck, J. V. (2017). Knockdown of nuclease activity in the gut enhances RNAi efficiency in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, but not in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 81, 103-116.
- Takeshita, D., Zenno, S., Lee, W. C., Saigo, K., & Tanokura, M. (2007). Crystal structure of the PIN domain of human telomerase-associated protein EST1A. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 68, 980-989.
- Taning, C. N. T., Christiaens, O., Berkvens, N., Casteels, H., Maes, M., & Smagghe, G. (2016). Oral RNAi to control *Drosophila suzukii*: laboratory testing against larval and adult stages. *Journal of Pest Science*, 89, 803-814.

- Taylor, A., Heschuk, D., Giesbrecht, D., Park, J. Y., & Whyard, S. (2019). Efficiency of RNA interference is improved by knockdown of dsRNA nucleases in tephritid fruit flies. *Open Biology*, 9, 190198.
- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J. S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., ... & Smagghe, G. (2011). RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 57, 231-245.
- Timmons, L., Court, D. L., & Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263, 103-112.
- Toprak, U., Baldwin, D., Erlandson, M., Gillott, C., Harris, S., & Hegedus, D. D. (2013). *In vitro* and *in vivo* application of RNA interference for targeting genes involved in peritrophic matrix synthesis in a lepidopteran system. *Insect Science*, 20, 92-100.
- Vogel, E., Santos, D., Mingels, L., Verdonck, T. W., & Broeck, J. V. (2019). RNA interference in insects: protecting beneficials and controlling pests. *Frontiers in Physiology*, 9, 1912.
- Wang, K., Peng, Y., Pu, J., Fu, W., Wang, J., & Han, Z. (2016). Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation *in vivo*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 77, 1-9.
- Wang, Y. T., Yang, W. J., Li, C. L., Doudeva, L. G., & Yuan, H. S. (2007). Structural basis for sequence-dependent DNA cleavage by nonspecific endonucleases. *Nucleic Acids Research*, 35, 584-594.
- Widlak, P., & Garrard, W. T. (2005). Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *Journal of Cellular Biochemistry*, 94, 1078-1087.
- Wynant, N., Santos, D., Verdonck, R., Spit, J., Van Wielendaele, P., & Broeck, J. V. (2014). Identification, functional characterization and phylogenetic analysis of double stranded RNA degrading enzymes present in the gut of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 46, 1-8.
- Yan, S., Ren, B., Zeng, B., & Shen, J. (2020). Improving RNAi efficiency for pest control in crop species. *Biotechniques*, 68, 283-290.
- Yao, Y., Lin, D. J., Cai, X. Y., Wang, R., Hou, Y. M., Hu, C. H., ... & Wang, J. D. (2022). Multiple dsRNases Involved in Exogenous dsRNA Degradation of Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Frontiers in Physiology*, 13, 850022.
- Yoon, J. S., Ahn, S. J., Flinn, C. M., & Choi, M. Y. (2021). Identification and functional analysis of dsRNases in spotted-wing drosophila, *Drosophila suzukii*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 107, e21822.
- Yoon, J. S., Kim, K., & Palli, S. R. (2020). Double-stranded RNA in exosomes: Potential systemic RNA interference pathway in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23, 1160-1164.
- Zhang, J., Khan, S. A., Hasse, C., Ruf, S., Heckel, D. G., & Bock, R. (2015). Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science*, 347, 991-994.
- Zhang, J., Khan, S. A., Heckel, D. G., & Bock, R. (2017). Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection. *Trends in Biotechnology*, 35(9), 871-882.
- Zhang, X., Fan, Z., Wang, Q., Kong, X., Liu, F., Fang, J., ... & Zhang, Z. (2022). RNAi Efficiency through dsRNA Injection Is Enhanced by Knockdown of dsRNA Nucleases in the Fall Webworm, *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 6182.

- Zhang, X., Liu, X., Ma, J., & Zhao, J. (2013). Silencing of cytochrome P450 CYP6B6 gene of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) by RNAi. *Bulletin of Entomological Research*, 103, 584-591.
- Zhao, S., & Fernald, R. D. (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology*, 12, 1047-1064.
- Zhu, F., Xu, J., Palli, R., Ferguson, J., & Palli, S. R. (2011). Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Management Science*, 67, 175-182.
- Zhu, K. Y., & Palli, S. R. (2020). Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference. *Annual Review of Entomology*, 65.

Anexo

Tabela 1. Composição da dieta artificial utilizada para *Diatraea saccharalis* para preparo de 1L de dieta.

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

- 1- Os Sais de Wesson contém os seguintes ingredientes: monofosfato de potássio (15,5 g); carbonato de cálcio (10,5 g); fosfato tri cálcico (7,45 g); cloreto de potássio (6 g); cloreto de sódio (5,25 g); sulfato de magnésio (4,5 g); sulfato de cobre (5H₂O) (0,019 g); sulfato de potássio e alumínio (0,005 g); iodeto de potássio (0,003 g); fosfato férrico (0,725 g); sulfato de manganês (0,01 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 solução vitamínica contém: 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 B12 (0,002 mg) e inositol 20 mg. Todos os componentes do complexo vitamínico podem ser adquiridos no mercado nacional e são formulados via úmida (vitamina B12) 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.

Tabela 2. Análise da eficiência dos *primers* para análise de expressão gênica do gene *Ds_up56* de *Diatraea saccharalis* via RT-qPCR de acordo como algoritmo PCR Miner.

Primer	Sequência	Eficiência (%)
<i>Ds_up56</i>	ACGTGCCTGATAACGTCAGA	81,46
	CACTGCACACTTCAACGGTC	
<i>RPS19</i>	AAAACTCTATGGGGTCTTCTCG	82,35
	GGTGACTTGTATGAATGATTGG	

5. O ENDOFÍTICO *Pantoea agglomerans* 33.1 COMO VETOR DE ENTREGA DE DSRNA PARA CONTROLE DE PRAGAS DE INSETOS-PRAGA POR RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi)

Resumo

O RNA de interferência (RNAi) apresenta potencial de ser uma alternativa para mitigar o impacto de pragas de insetos na agricultura pela exposição a dsRNAs (RNA dupla fita), homólogos a um gene essencial do inseto alvo. O método de entrega de dsRNA por expressão em microorganismos apresenta algumas vantagens como produção em larga escala, menor custo e proteção contra a degradação causada pelo pH alcalino do intestino médio do inseto e atividade de nucleases. Além do uso de bactérias de vida livre, como *Escherichia coli*, e simbioses de insetos, existe uma oportunidade de obter silenciamento gênico com o uso de bactérias endofíticas para entrega de dsRNA ao inseto-alvo. A espécie *Pantoea agglomerans* 33.1 é uma bactéria Enterobacteriaceae Gram-negativa, frequentemente encontrada associada a uma ampla gama de espécies vegetais, incluindo cana-de-açúcar. Essa colonização traz benefícios aos hospedeiros, pois *P. agglomerans* 33.1 contribui para a promoção do crescimento das plantas, seja pela produção de ácido indol-acético, solubilização de fosfato ou fixação de nitrogênio. Todavia, o sucesso do RNAi mediado por microorganismos depende da ausência de uma RNase III ativa, codificada pelo gene *rnc* nesses organismos para permitir o acúmulo de moléculas de dsRNAs. A RNase III é crucial para o processamento de vários tipos de RNAs, mas também é caracterizada pela degradação de dsRNAs. Portanto, para desenvolver uma bactéria endofítica vegetal expressando dsRNA visando pragas da cana-de-açúcar como método de controle, buscamos realizar o *knockdown* do gene da RNase III (*rnc*) de *Pantoea agglomerans* 33.1 de modo a permitir o acúmulo de dsRNA contra genes-alvo do inseto. Identificamos e caracterizamos o gene *rnc* de *P. agglomerans* 33.1. Posteriormente, esse gene foi nocauteado por meio de recombinação homóloga λ -red. Transformantes de *P. agglomerans* 33.1 com o gene *rnc* nocauteado obtidos foram avaliados para sua capacidade de colonizar tecidos de cana-de-açúcar, bem como manter a promoção das plantas de cana de açúcar de forma similar ao tipo selvagem, o que foi demonstrado. Finalmente, transformamos a linhagem nocauteada *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* com vetor de silenciamento pdag para expressar dsRNA contra um gene específico de *D. saccharalis* e comprovamos, desta forma, a ocorrência de acúmulo de dsRNA no hospedeiro bacteriano. Por conseguinte, este trabalho propõe a utilização de *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* como vetor de entrega RNAi para o controle de insetos-praga, demonstrando ser uma alternativa potencial para a proteção de culturas agrônômicas relevantes.

Palavras-chave: Bactéria; Biopesticida; *Knockout*; RNA de interferência; RNaseIII.

Abstract

RNA interference (RNAi) has the potential to be an alternative to mitigate the impact of insect pests in agriculture by exposure to dsRNAs, homologous to an essential gene of the target insect. The delivery method of double-stranded RNA (dsRNA) by expression in microorganisms has advantages such as large-scale production, lower cost, and protection against degradation caused by the alkaline pH of the insect midgut and nuclease activity. In addition to using free-living bacteria such as *Escherichia coli* and insect symbionts, there is an opportunity to achieve gene silencing using endophytic bacteria to deliver dsRNA to the

target insect. The species *Pantoea agglomerans* 33.1 is a Gram-negative Enterobacteriaceae bacterium, often found associated with a wide range of plant species, including sugarcane. This colonization benefits the hosts, as *P. agglomerans* 33.1 contributes to the promotion of plant growth by producing indole acetic acid, phosphate solubilization, or nitrogen fixation. However, the success of RNAi mediated by microorganisms depends on the absence of an active RNase III, encoded by the *rnc* gene in these organisms, to allow the accumulation of dsRNA molecules. RNase III is crucial for processing various types of RNAs, but the degradation of dsRNAs also characterizes it. Therefore, to develop a plant endophytic bacterium expressing dsRNA targeting sugarcane pests as a control method, we looked to knockdown the RNase III of *Pantoea agglomerans* 33.1 to allow the accumulation of dsRNA against the target genes of the insect. We identified and characterized the *rnc* gene of *P. agglomerans* 33.1. Subsequently, this gene was knocked out utilizing λ -red homologous recombination. *P. agglomerans* 33.1 transformants with the edited *rnc* gene (*P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc*) were successfully obtained and demonstrated to maintain their viability and ability to colonize sugarcane tissues, as well as maintain the promotion of sugarcane plants in a similar way to wild type. Finally, we transformed the knockout strain *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* with a pdag silencing vector to express dsRNA against a specific gene of *D. saccharalis*. In this way, we confirmed the occurrence of dsRNA accumulation in the bacterial host. Therefore, this work proposes using *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* as an RNAi delivery vector for insect pest control, a potential alternative for protecting relevant agronomic crops.

Keywords: Bacteria; Biopesticide; Knockout; RNA Interference; RNaseIII.

5.1. Introdução

O RNA de interferência (RNAi) refere-se à regulação da expressão gênica por meio de RNA dupla-fita (dsRNA) com homologia à transcritos em eucariotos. Desde a sua descoberta em 1998, o RNAi provou ser uma ferramenta importante em análises funcionais de genes (McGinnis, 2010; Tang *et al.*, 2007), bem como um mecanismo essencial de defesa molecular (Obbard *et al.*, 2009) e regulação gênica (Axtell *et al.*, 2011; Eamens *et al.*, 2008). O RNAi também representa uma alternativa versátil e ecológica aos meios tradicionais de controle de pragas e doenças agrícolas, pois o dsRNA expresso por ou aplicado a plantas pode silenciar genes de invertebrados ou microrganismos eucariotos com alta especificidade (Goodfellow *et al.*, 2019). Este potencial é, no entanto, limitado pela falta de um meio rápido, flexível e eficaz de introdução de dsRNA precursor às espécies alvo.

No contexto de aplicação em campo, a abordagem de RNAi para proteção de cultivos pode ser aplicada *in planta* por meio da produção de uma cultura geneticamente modificada (GM), na qual o silenciamento de genes induzido pelo hospedeiro (HIGS – *host induced gene silencing*) pode ser realizado integrando de forma estável construções baseadas em RNAi projetados contra uma ou várias sequências alvo (Factor *et al.*, 2021). Alternativamente, a estratégia de RNAi pode ser empregada por meio da aplicação exógena de um produto

formulado com dsRNA como ingrediente ativo (SIGS – *spray induced gene silencing*), ou por meio de vírus modificado (silenciamento gênico induzido por vírus), bactérias modificadas (vivas ou inativadas) ou fungos modificados (Zotti *et al.*, 2018).

Um número crescente de eventos baseados em RNAi *in planta* foi desenvolvido, avaliado quanto aos riscos e receberam aprovação de agências reguladoras internacionais em diversos países (ISAAA, 2022). Esses eventos abrangem uma ampla variedade de espécies de plantas, do milho à batata, bem como uma série de características, incluindo resistência a vírus, resistência a pragas e modificação da composição de plantas (Taning *et al.*, 2020). No entanto, a dificuldade na transformação genética de algumas espécies cultivadas, as exigências de capital dispendioso e as preocupações políticas/públicas em torno do cultivo e uso de culturas geneticamente modificadas favoreceram a necessidade de desenvolver produtos de uso final contendo dsRNA pulverizável (SIGS) (Taning *et al.*, 2020). Além disso, a resistência a pragas de insetos induzida por RNAi requer o acúmulo de dsRNA longo, que pode ocorrer em níveis baixos em plantas transgênicas, devido ao processamento pela própria maquinaria de RNAi da planta (Bally *et al.*, 2018). Essas dificuldades podem ser contornadas pelo oferecimento de dsRNA exógeno usando síntese química (Micura *et al.*, 2002), *in vitro* (Sohail *et al.*, 2003), ou síntese biológica de dsRNA (Huang *et al.*, 2013; Braasch *et al.*, 2003), que são mais simples de personalizar e preparar. Nesse sentido, o RNAi exógeno, ou a aplicação de efetores de RNAi sintetizados externamente, representa um método alternativo de entrega de RNAi para proteção de plantas (Dubrovina & Kiselev, 2019).

Os métodos de síntese biológica normalmente utilizam cepas bacterianas deficientes em RNase de fita dupla, que são transformadas com genes que expressam hpRNA ou dsRNA (Huang *et al.*, 2013). Essas bactérias podem ser cultivadas em meio de cultura, e em seguida, submetidas à morte por calor (Vatanparast & Kim, 2017) ou lise (Tenllado *et al.*, 2003), para extração do dsRNA produzido, que em seguida, será aplicado diretamente às plantas. Esse método, embora mais lento para personalizar devido ao tempo requerido à produção e clonagem de novos genes geradores de RNA em bactérias, é mais barato, especialmente para aplicações de alto volume, onde é necessária uma grande quantidade de RNA silenciador (Goodfellow *et al.*, 2019).

No entanto, o método de síntese biológica, denominado interferência de RNA mediada por bactérias (bmRNAi), que se refere a um método de entrega em que bactérias vivas que expressam dsRNA são aplicadas a um organismo alvo para produzir e facilitar a absorção de dsRNA *in situ*, resultando em *knockdown* do gene alvo (Keates *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2009). O método bmRNAi demonstrou ser eficaz em superar as desvantagens das estratégias

de aplicação endógenas e exógenas convencionais, aumentando a duração e a eficácia do efeito silenciador e reduzindo o tempo e esforço necessário para produzir *knockdown* (Goodfellow *et al.*, 2019). Outras vantagens são dificuldades e custos reduzidos - a maioria das plantas abriga bactérias comensais que são capazes de crescer rapidamente em meios de cultura (Liu *et al.*, 2017) e o fato do dsRNA estar protegido e, portanto, parcialmente resistente à degradação pelo hospedeiro antes de induzir um efeito (Zhang *et al.*, 2015).

O processo de desenvolvimento para bmRNAi normalmente envolve a seleção e modificação de uma bactéria de entrega apropriada e, em seguida, a introdução de uma construção de expressão, como um plasmídeo, para permitir que a bactéria produza dsRNA (Goodfellow *et al.*, 2019). Entretanto, para serem capazes de acumular o dsRNA, as bactérias de entrega devem ser desprovidas de RNase III, que degradam RNA de dupla-fita (Gan *et al.*, 2010; Goodfellow *et al.*, 2019, Whitten *et al.*, 2016). Isso evita a degradação do dsRNA na bactéria, permitindo uma montagem mais eficiente de RISCs pelo alvo (Holoch & Moazed, 2015; Wang *et al.*, 2009). A escolha da bactéria de entrega também pode ser crítica, podendo variar entre bactérias de vida livre, como *Escherichia coli*, a simbioses de insetos ou endofíticas. Aplicações de longo prazo - como a mediação por microrganismos simbioses do inseto- exigem que a bactéria se replique *in vivo*, necessitando de uma compreensão da microbiota do inseto receptor e possíveis interações com o hospedeiro para obter os melhores resultados (Goodfellow *et al.*, 2019). Essa estratégia já foi utilizada para o silenciamento de genes dos insetos *Rhodnius prolixus* e *Frankliella occidentalis*, por meio da expressão de dsRNA por bactérias simbiote (Whitten *et al.*, 2016).

Além disso, existe uma oportunidade de melhorar o efeito do silenciamento, com o uso de bactérias endofíticas para entrega de dsRNA ao inseto-alvo. Conjuntos especializados como bactérias endofíticas podem penetrar nos tecidos do hospedeiro mais extensivamente do que aqueles que não possuem as adaptações associadas, facilitando não somente a permanência do microrganismo na cultura por mais tempo, com também atingindo maior extensão da planta, favorecendo assim o controle do inseto que se alimenta da espécie vegetal colonizada (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Thomas & Sekhar, 2014). Em contraste com isso, aplicações de curto prazo ou únicas - onde a bactéria morre após ser internalizada- são menos sensíveis a essa consideração e podem não ocasionar um efeito tão significativo e duradouro (Goodfellow *et al.*, 2019). Sendo assim, bactérias endofíticas associadas a plantas têm um potencial significativo a esse respeito.

Bactérias endofíticas são aquelas que residem parcialmente ou durante toda a sua vida dentro dos tecidos vegetais e não causa indícios aparentes ou visíveis de qualquer doença

(Azevedo & Quecine, 2019); pelo contrário, compartilham inúmeras características essenciais para a promoção do crescimento da planta hospedeira (Compant *et al.*, 2010), fornecendo inúmeros benefícios às plantas hospedeiras, podendo ajudar a tolerar vários estresses bióticos e abióticos que podem desafiar seu crescimento (Miliute *et al.*, 2015). Essas bactérias podem existir dentro da planta hospedeira em diversos locais, incluindo partes aéreas e subterrâneas e até sementes, afetando positivamente o desenvolvimento da planta (Chebotar *et al.*, 2015). Esses microrganismos endofíticos beneficiam a planta hospedeira diretamente, promovendo a disponibilidade de nutrientes, a fixação biológica de nitrogênio e a produção de fitohormônios (Adesemoye e Egamberdieva, 2013; Suman *et al.*, 2005). Indiretamente, podem atuar como agentes de controle biológico para reduzir patógenos microbianos, por meio de antibiose, competição e/ou indução de resistência sistêmica (Lugtenberg e Kamilova, 2009). Em contrapartida, as bactérias usam a endosfera da planta como um nicho ecológico protetor único que fornece um ambiente seguro e consistente, imperturbável pelas condições ambientais flutuantes (Senthilkumar *et al.*, 2011).

Cerca de 300.000 espécies de plantas que existem na Terra são consideradas hospedeiras de um ou mais endófitos (Ryan *et al.*, 2008). Numerosos estudos descreveram bactérias endofíticas que podem promover o crescimento de plantas como trigo, arroz, canola, batata, tomate, entre outras (Mei e Flinn, 2010; Sturz e Nowak, 2000; Ma *et al.*, 2011b; Sessitsch *et al.*, 2005). Esta ampla gama de endófitos e hospedeiros torna estes microrganismos potenciais ferramentas para serem utilizados como biofertilizantes e biopesticidas (Afzal *et al.*, 2019; Backer *et al.*, 2018).

Os membros de Enterobacteriaceae (bactérias Gamma proteo) são colonizadores frequentes de endo e rizosfera de gramíneas e outras culturas (Coleman-Derr *et al.*, 2016). O gênero bacteriano *Pantoea* compreende muitas espécies versáteis que foram isoladas de uma infinidade de ambientes. Foram relatadas como colonizadores rizosféricos e endofíticos de plantas de milho e trigo (Mcinroy & Kloepper, 1995; Ruppel *et al.*, 1992), caules de batata (Sturz & Matheson, 1996; Asis & Adachi, 2003), sementes de arroz (Verma & Tripathi, 2001; Verma *et al.*, 2004) e folhas cítricas (Araújo *et al.*, 2002), bem como bem como ervilha (Elvira-Recuenco & van Vuurde, 2000), eucalipto (Procópio, 2004), soja (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004), algodão (Mcinroy & Kloepper, 1995), café (Vega *et al.*, 2005) e feijão (Hsieh *et al.*, 2005). Vários estudos relataram o potencial de *Pantoea* spp. como promotor de crescimento vegetal por solubilizar fósforo, estimular a produção de fitohormônios, induzir resistência sistêmica e proteção contra pragas e microrganismos fitopatogênicos (Sergeeva *et al.*, 2007; Dastager *et al.*, 2009). O grupo *Pantoea* sendo um grupo onipresente e versátil de

tratabilidade genética está apto para explorar adaptação e oportunismo específicos de nicho. *Pantoea* spp. também estão sendo explorados para o desenvolvimento de produtos agrícolas, médicos e ambientais (Walterson & Stavrinides, 2015).

Uma cepa de *Pantoea agglomerans* cepa 33.1 foi isolada de *Eucalyptus grandis* e é reconhecida como promotora de crescimento do eucalipto, e foi avaliada quanto aos aspectos biotecnológicos da associação com cana-de-açúcar (Azevedo & Quecine, 2019). Esta cepa foi capaz de promover o crescimento da cana-de-açúcar e induzir a produção de proteínas de resistência nas plantas inoculadas com a cepa bacteriana (Quecine *et al.*, 2012). A produção de hormônios vegetais e fosfatase pela cepa 33.1 foi associada a mecanismos bacterianos promotores de crescimento da cana-de-açúcar (Quecine *et al.*, 2012). Com o objetivo de elucidar o comportamento da cepa 33.1 durante sua interação com a cana-de-açúcar, bactérias abrigando um plasmídeo pNKGFP integrativo (33.1::pNKGFP) foi inoculado em mudas de cana-de-açúcar. Foi então possível observar a presença e a maior densidade de 33.1::pNKGFP na rizosfera da planta (Quecine *et al.* 2012). A cepa *P. agglomerans* 33.1 foi modificado para expressar o gene *cryIAc7* contido no plasmídeo pJTT (Quecine *et al.* 2014). Bioensaios de controle de *Diatraea saccharalis* por *cryIAc7* foram realizados. Quando 33.1:pJTT foi aplicada em colmos de cana-de-açúcar contendo larvas de *D. saccharalis*, aumentou a letalidade larval, bem como a duração do período de desenvolvimento larval, e os pesos larvais foram significativamente reduzidos (Quecine *et al.* 2014). Bioensaios de controle de *Diatraea saccharalis* por 33.1:pJTT confirmaram o controle parcial das larvas do inseto por 33.1:pJTT. Quando 33.1:pJTT foi aplicado em colmos de cana-de-açúcar contendo larvas de *D. saccharalis*, a letalidade larval aumentou, bem como o desenvolvimento larval e os pesos larvais foram significativamente reduzidos, mostrando o potencial de *P. agglomerans* 33.1 em expressar a proteína Cry, contribuindo com o controle de *D. saccharalis* (Quecine *et al.*, 2014).

Logo, considerando este contexto, buscamos desenvolver um vetor de entrega de RNAi baseado no uso da bactéria endofítica de cana-de-açúcar, *Pantoea agglomerans* 33.1, com o gene *rnc* nocauteado e expressando dsRNA contra gene-alvo específico do inseto, para o controle do inseto-praga *Diatraea saccharalis*.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Amplificação do 16S rRNA de *P. agglomerans* 33.1

Para confirmar a identidade da cepa bacteriana de *P. agglomerans* 33.1 disponível, foi realizada a amplificação do gene que codifica o 16S rRNA. A cepa da bactéria em questão foi

gentilmente cedida pela Prof. Maria Carolina Quecine Verdi, do Departamento de Genética da ESALQ/USP. A bactéria foi crescida por 16 h a 37°C em meio LB-ágar sem adição de antibióticos. Em seguida, foi crescida por mais 16 h a 37°C em meio LB líquido sem adição de antibióticos. Foi então realizada a extração do DNA genômico da bactéria utilizando o *kit DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Na reação de amplificação do gene 16S empregou-se 1 ng de DNA genômico bacteriano, 1,5 mM de MgCl₂, 100 µM de cada dNTP, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas), em tampão (NH₄)₂SO₄, e 0,5 µM de cada *primer* (GAGAGTTTGATCCTGGCTGAC e CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG; tamanho esperado do amplicon: 1400 pb), em um volume final de 25 µL. A amplificação empregou as seguintes condições: 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 62°C por 30 s e 72°C por 1 min, finalizando a 72°C por 10 min. Em seguida, a amplificação foi analisada por eletroforese em gel de 1% agarose e o fragmento de interesse foi recortado do gel com o auxílio de uma lâmina estéril e purificado utilizando-se o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). O sequenciamento foi feito empregando o kit *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (GE Health Sciences, Champaign, IL, EUA) em sequenciador *3500 Genetic Analyser*. Para confirmação da espécie foi realizado um *BLASTn* no NCBI com a sequência do gene 16S rRNA obtida.

5.2.2. Análise filogenética de *P. agglomerans* 33.1

A análise filogenética de *P. agglomerans* 33.1 foi realizada utilizando-se o gene do 16S rRNA sequenciado. Inicialmente, foi realizado um *BLASTn* (NCBI) com a sequência de *P. agglomerans* 33.1 buscando encontrar as sequências mais próximas para a análise filogenética. A sequência correspondente à RNaseIII de *Escherichia coli*, espécie de bactéria gram-negativa e próxima à *P. agglomerans* foi propositalmente escolhida. A identificação de acessos das sequências utilizadas se encontram disponíveis na Tabela 1. Além das sequências similares, foi também escolhida a sequência de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 por ser gram-negativa e, portanto, sabidamente uma espécie mais distante de *P. agglomerans* 33.1.

O programa MEGA v7.0.26 foi utilizado para realizar o alinhamento das sequências (MUSCLE-alinhamento global), e escolha do melhor modelo evolutivo e construção da árvore filogenética. A história evolutiva foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança (*Maximum Composite Likelihood* – MCL) com base no modelo Kimura (Kimura, 1988), selecionando a topologia com um valor superior de *log* de verossimilhança. Uma distribuição discreta *Gamma* foi utilizada para modelar as diferentes taxas evolutivas. A análise envolveu 17 sequências e todas as posições que continham lacunas e dados perdidos

foram eliminadas.

Tabela 8. Lista de espécies de bactérias cujas sequências de 16S rRNAs foram utilizadas para o alinhamento com a sequência de *Pantoea agglomerans* 33.1, com seus respectivos números de acessos no banco de dados online *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Organismo cuja sequência do 16S rRNA foi utilizada para o alinhamento	Acesso #id NCBI
<i>Pantoea</i> sp. strain ZYJG-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KX887308.1
<i>Pantoea agglomerans</i> strain Mz23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	MF289156.1
<i>Pantoea agglomerans</i> strain YTGR1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KX619646.1
<i>Pantoea agglomerans</i> strain AJ-G53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KC895500.1
<i>Pantoea septica</i> strain KTH-64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	HM854257.1
<i>Pantoea agglomerans</i> strain TAbd1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT184494.1
<i>Pantoea</i> sp. strain ZYJG-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KX887309.1
<i>Pantoea agglomerans</i> strain gs1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KM985370.1
<i>Pantoea conspicua</i> strain KNUC9005 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JF505939.1
<i>Pantoea agglomerans</i> strain GCXG-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	MF101164.1
<i>Buttiauxella noackiae</i> strain 1897PAA001_G1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KX885537.1
<i>Buttiauxella noackiae</i> strain 1897PAA001_F6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KX885536.1
<i>Pantoea agglomerans</i> strain FDAARGOS_160, complete genome	CP014129.1
<i>Pantoea ananatis</i> strain B19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT005535.1
<i>EscheriCHla coli</i> str. K-12 substr. MG1655, complete genome	NC_000913.3
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168 chromosome, complete genome	NC_000964.3

5.2.3. Amplificação do gene *rnc* de *P. agglomerans* 33.1, clonagem em pGEM-T Easy e caracterização estrutural e funcional da proteína RNaseIII

A partir do DNA genômico extraído de *P. agglomerans* 33.1, o gene *rnc* de *P. agglomerans* 33.1, que codifica a proteína RNaseIII (Pa-RNaseIII), foi amplificado utilizando-se pares de primers degenerados (ATGAACCCCATCCT(G/C/T)ATTAA;(T/C)TATTC(C/G)AG(G/A)CCTA(G/A)TTT(A/T)A ; tamanho esperado do amplicon: 681 pb), desenhados a partir de regiões conservadas de sequências de outras espécies de *Pantoea* e de *E. coli* K12 disponíveis em banco de dados (NCBI e UniProt). A reação de amplificação continha 100 ng de DNA genômico bacteriano

extraído, 400 μM de dNTP, 1,5 mM MgCl_2 , 0,5 μM de cada *primer*, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas) em tampão $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, num volume final de 25 μL . A amplificação foi conduzida nas seguintes condições: 95° por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s, 52°C por 30 s e 72°C por 1 min, finalizando a 72°C por 5 min. Posteriormente, a amplificação foi analisada por eletroforese em gel de 1% agarose. O fragmento de interesse foi recortado do gel e purificado utilizando-se o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). O fragmento purificado foi clonado em pGEM-T *Easy*, dando origem à construção pGEM-T::*rnc*. Para isto, cerca de 50 ng de DNA amplificado, purificado e quantificado em *DyNA Quant 200 fluorometer* (Hoefer; Holliston, MA, EUA) foi aliquoteado juntamente com tampão de ligação, 50 ng de vetor pGEM-T *Easy* e 5 U de T4 DNA ligase (Promega) e incubados a 4°C por 16 h em reações de 10 μL . Em seguida, 2 μL da reação foram utilizados para a transformação de *E. coli* TOP10 eletrocompetente empregando *MicroPulser Eletroporator Apparatus* (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio contendo 100 mg L^{-1} de ampicilina, 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de X-Gal e 0,1 mM de IPTG para seleção das bactérias transformantes. Bactérias positivas para a transformação foram inoculadas em meio LB líquido contendo 100 mg mL^{-1} de ampicilina e realizada extração do DNA plasmidial por lise alcalina. Para confirmar a 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 (TAATACGACTCACTATAGGG) ou SP6 (TATTTAGGTGACACTATAG), e foram conduzidas sob as seguintes condições: 35 ciclos de 95°C por 15 s, 50°C por 15 s e 60°C por 2 min, e foram analisadas em sequenciador *3500 Genetic Analyser*. A partir do resultado do sequenciamento, foi realizado BLASTx com a sequência obtida da Pa-RNaseIII para comparação com a sequência desta proteína com demais organismos e validação de que se tratava de uma proteína RNaseIII.

Uma vez confirmada a sequência do gene *rnc*, análises das características físico-químicas da proteína Pa-RNaseIII foram realizadas utilizando ProtParam do servidor *ExPasy* (<http://web.expasy.org/protparam/>). Os parâmetros estimados pelo programa incluem peso molecular, ponto isoelétrico teórico (pI), composição de aminoácidos, número total de resíduos positivos e negativos, índice de instabilidade (II), índice alifático (IA) e média de hidropaticidade (GRAVY). Para prever a estrutura secundária presumível (α hélices, fitas β e bobinas) da Pa-RNaseIII, foi utilizado a plataforma SOPMA (última data de modificação: maio de 2016) (Geourjon & Deléage, 1995). Além disso, PSIPRED v.3.3 (Buchan *et al.*, 2013) e *PredictProtein* v.1 (Rost *et al.*, 2004) também foram explorados para validar os resultados obtidos a partir do SOPMA.

A sequência de aminoácidos da Pa-RNaseIII no formato FASTA foi ainda analisada usando InterPro v.60.0 com a finalidade de identificar seus possíveis domínios e também realizar sua classificação quanto à família proteica a qual pertence. Para classificar as proteínas, o InterPro utiliza modelos preditivos, fornecidos por diversas bases de dados, com base na similaridade de sequências (Mitchell *et al.*, 2015). Em seguida, para ilustrar os domínios encontrados, uma figura representativa foi criada com o uso da ferramenta *MyDomains* disponível no PROSITE v.20.0 (Hulo *et al.*, 2006).

Outra análise realizada foi a atribuição de termos *GO* à sequência proteica da Pa-RNaseIII. As ontologias estão organizadas em função molecular, processo biológico e componente celular (<http://www.geneontology.org/>). A atribuição de termos *GO* à sequência da proteína Pa-RNaseIII foi conduzida para obter informações sobre a atividade e a localização deste produto gênico. Primeiramente foi selecionada uma sequência de proteína RNaseIII do banco de dados do UniProt - SwissProt, que fosse similar (presumidamente homóloga) à proteína em estudo e que também estivesse sob curadoria. Para isto, a sequência de Pa-RNaseIII foi submetida a um BLAST no próprio site do Uniprot e o *hit* selecionado foi a proteína RNaseIII de *E. coli* (P0A7Y0) sob o nome de entrada “Ribonuclease 3”. O ID de acesso P0A7Y0 foi inserido na barra de buscas do servidor AmiGO 2 v.2.5.5 e os resultados de termos GO obtidos para esta entrada foram transferidos por similaridade e homologia, à sequência polipeptídica Pa-RNaseIII.

5.2.4. Knockout do gene *rnc* de *P. agglomerans* 33.1 utilizando a técnica de recombinação λ -red

A utilização da técnica de recombinação λ -red havia sido empregada para o *knockout* do gene *rnc* na bactéria simbiote BFo2 (*bacteria from Frankliniella occidentalis*), utilizada como hospedeiro para entrega de dsRNA ao inseto-alvo *Frankliniella occidentalis* (Whitten *et al.*, 2016). O método empregado por nós para o *knockout* em *P. agglomerans* 33.1 foi realizado em parceria com o professor Paul Dayson da Universidade de Swansea, Reino Unido, o qual gentilmente nos cedeu o plasmídeo (pIJ790) e a metodologia necessários para o desenvolvimento da técnica.

Inicialmente, o gene *rnc* de *P. agglomerans* 33.1, que estava previamente clonado em pGEM-T *Easy*, foi interrompido por meio da inserção de um gene de resistência a canamicina (*kanR*). Para tanto, o gene *kanR* foi amplificado utilizando-se como molde o vetor pCas (Addgene: #62225) e empregando-se *primers* que continham bordas com sítios de reconhecimento para as enzimas *Bss*HII (TAAGCAGCGCGCATGAGCCATATTCAACGG)

e *SrfI* (TGCAATGCCCGGGCTTAGAAAACTCATCGAGCA), que não ocorrem dentro da região codificadora. A reação de amplificação foi realizada contendo cerca de 100 ng de plasmídeo pCas, 1,5 mM de MgCl₂, 100 μM de dNTP, 0,1 μM de cada *primer* e 2 U de *Taq* polimerase em tampão de (NH₄)₂SO₄ em volume final de 25 μL. As condições do termociclador foram 95°C por 2 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 51°C por 30 s, 72°C por 2 min, com 72°C por 5 min de extensão final. A reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE e o fragmento de interesse foi extraído do gel e purificado com o *QIAquick Gel Extraction Kit*. O fragmento purificado foi então clonado em vetor pGEM-T *Easy*. A próxima etapa consistiu na digestão de pGEM-T::*kanR* com as enzimas *BssHII* e *SrfI*, na qual foram adicionados 1 μg de DNA do vetor, extraído via minipreparação plasmidial das bactérias transformadas positivas, 1X de 10X *Cut Smart Buffer* e 10 U da enzima *SrfI*, em reações de 50 μL. Esta primeira digestão foi incubada por 1h a 37°C. Após este período, adicionou-se 10 U da enzima *BssHII* e incubou-se, por mais 1 h a 50°C. O produto da digestão dupla foi visualizado por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão TAE. O fragmento correspondente ao gene *kanR* foi recortado do gel com auxílio de lâmina estéril e purificado utilizando-se o *QIAquick Gel Extraction Kit*. O plasmídeo pGEM-T::*rnc* foi digerido da mesma forma, utilizando-se as mesmas enzimas *BssHII* e *SrfI* e seguindo a mesma reação de digestão dupla descrita acima, com a finalidade de clivar o gene *rnc* em locais específicos, uma vez que os sítios de reconhecimento para estas enzimas localizam-se nas posições/nucleotídeos 274 e 507 do mesmo, respectivamente.

Em seguida, a construção pGEM-T::*rnc* clivado foi unida ao fragmento *kanR* recuperado. Para este propósito, aproximadamente 72 ng do fragmento *kanR* foi aliquotado em microtubo com 50 ng do vetor, 5 U de T4 DNA ligase (Fermentas), juntamente com tampão de ligação, e incubados a 4°C por 16 h em reações de 10 μL. Procedeu-se às etapas de transformação das bactérias, seleção das transformantes positivas, minipreparação plasmidial por lise alcalina e confirmação da identidade da construção genética por meio de sequenciamento, a fim de confirmar se o gene da RNaseIII, *rnc*, realmente encontrava-se interrompido pela sequência do gene *kanR*. Este último passo foi realizado para permitir a confirmação da obtenção do cassete molde para a recombinação homóloga em *P. agglomerans* 33.1. Este cassete basicamente se constitui por dois braços homólogos ao gene *rnc* flanqueando o gene de resistência ao antibiótico canamicina (Figura 1).

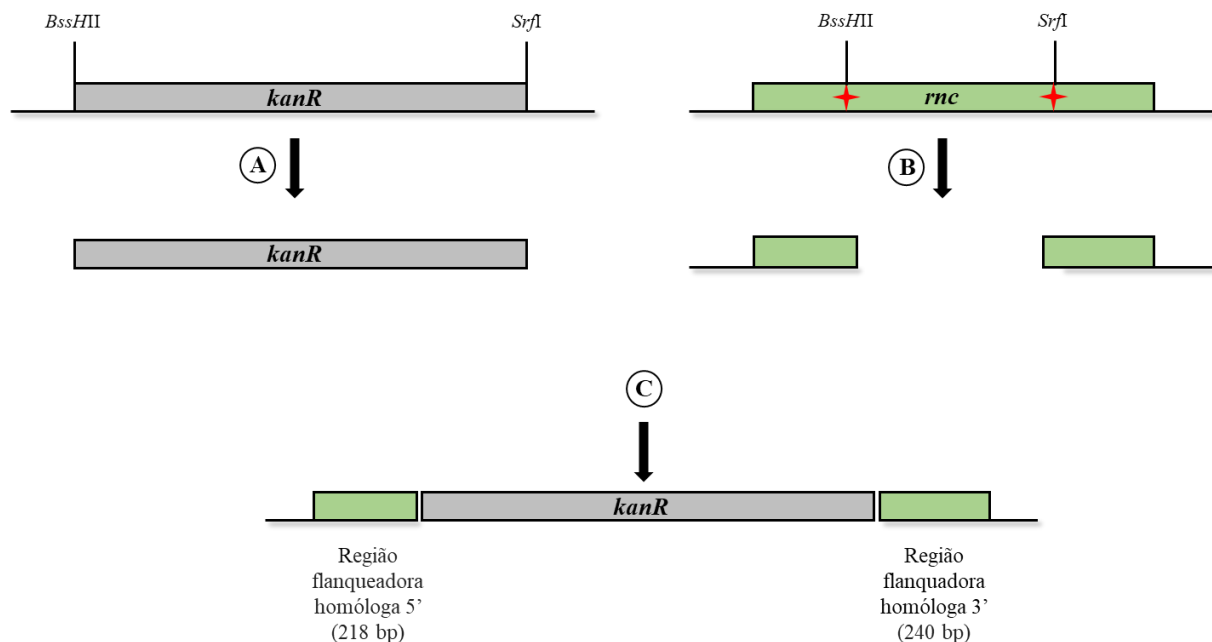


Figura 1. (A) Digestão do vetor pGEM-T::*kanR* com *BssHII* e *SrfI*, liberando o fragmento de interesse *kanR*. Na figura, são indicados os sítios de reconhecimento das enzimas que foram adicionados, via PCR, exatamente nas extremidades da sequência gênica completa (em cinza). A seta indica o inserto recuperado após a digestão. (B) Digestão do vetor pGEM-T::*rnc* com *BssHII* e *SrfI* (em verde), a partir da qual foi recuperado o vetor contendo o gene *rnc* rompido após a digestão. Asteriscos vermelhos marcam as posições na sequência do gene *rnc* em que as enzimas realizaram o corte. (C) A ligação do inserto recuperado em (A) com o vetor recuperado em (B) deu origem ao cassete molde para recombinação homóloga. Este molde é constituído pelo gene *kanR* flanqueado, *upstream* e *downstream* por regiões homólogas ao gene *rnc*, com tamanho de 218 pb e 240 pb, respectivamente.

Após obtenção do cassete molde de recombinação homóloga, procedeu-se à recombinação homóloga propriamente dita da bactéria *P. agglomerans* 33.1. Preliminarmente, o plasmídeo para indução de recombinação homóloga pIJ790 foi recuperado de *E. coli* por meio de minipreparação plasmidial. Em seguida, 2 μL desta miniprep foram utilizados para a transformação de células de *P. agglomerans* 33.1 eletrocompetentes (*Gene Pulser*, BioRad, -2,5kV, 25 μF , 200 Ω , cubetas de 0,2 cm). Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio contendo 25 mg L^{-1} de cloranfenicol para seleção das bactérias transformantes. Bactérias positivas para a transformação foram inoculadas em meio LB líquido contendo 25 mg mL^{-1} de cloranfenicol, por 48 h a 28°C e sob agitação (120 rpm) como pré-inóculo. Inoculou-se 10 mL de meio SOB (sem adição de Mg_2SO_4) contendo cloranfenicol (25 mg L^{-1}) com 1% da cultura *overnight* (pré-inóculo) de *P. agglomerans* 33.1 / pIJ790. Adicionou-se também ao meio, 100 μl de solução estoque de 1 M L-arabinose, atingindo uma concentração final de 10 mM, para indução dos genes de recombinação presentes no plasmídeo. A cultura foi crescida por 4 h a 30°C, agitando a 200 rpm até atingir uma OD_{600} de aproximadamente 0,4. As células foram recuperadas por centrifugação a 3000 g por 5 min a 4°C em um rotor Sorvall GS3. O meio foi decantado e o sedimento bacteriano foi ressuscitado misturando-se

suavemente em 10 mL de glicerol 10%. Novamente realizou-se uma outra centrifugação como a anterior e ressuspendeu-se o sedimento em 5 mL de glicerol 10% gelado. Foi realizada uma última centrifugação, decantação e ressuspensão do *pellet* celular remanescente em 100 μ l de 10% glicerol. Então, à 50 μ l de suspensão celular foi misturado aproximadamente 100 ng do cassete molde de recombinação (p-GEM-T: *rnc*-kan^R-*rnc*). Efetuou-se a eletroporação numa cuveta utilizando *Gene Pulser*, BioRad, regulado para - 2,5kV, 25 μ F, 200 Ω , cubetas de 0,2 cm. Imediatamente foi adicionado 1 mL de meio LB líquido gelado e incubaram-se as células sob agitação (120 rpm) por 2 h a 28°C. Por fim, as células bacterianas foram espalhadas em meio LB ágar contendo 50 mg L⁻¹ canamicina e incubadas *overnight* a 37°C para promover a perda (cura) do plasmídeo pIJ790.

A confirmação das bactérias *P. agglomerans* 33.1 nocauteadas, ou seja, as que sofreram recombinação e tiveram o gene *rnc* interrompido pelo gene de resistência a canamicina foi realizada por meio de PCR utilizando *primers* específicos do gene e sequenciamento, também utilizando *primers* específicos do gene e seguindo as condições apresentadas anteriormente.

5.2.5 Ensaio de cinética de crescimento de *P. agglomerans* 33.1 nocauteada

Após o *knockout* do gene *rnc* da bactéria *P. agglomerans* 33.1, pudemos observar que a sobrevivência da bactéria não foi afetada, ou seja, a interrupção do gene *rnc* mostrou não ser essencial nesta espécie, já que *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* foi capaz de multiplicar em meio de cultura sólido e líquido. No entanto, com o propósito de confirmar que além da sobrevivência, sua viabilidade também não foi prejudicada após o nocaute gênico, realizamos um ensaio de cinética de crescimento com a linhagem nocauteada.

As linhagens de *P. agglomerans* 33.1 selvagem (*P.agg.33.1* WT) e *P. agglomerans* 33.1 com o gene *rnc* nocauteado (*P.agg.33.1* Δ *rnc*), foram inicialmente crescidas em um pré-inóculo de 10 mL de meio de cultura LB, acrescido ou não de 50 μ g mL⁻¹ do antibiótico canamicina, por 16 h a 28°C em agitador orbital (140 rpm). Após o crescimento, a densidade óptica (O.D._{600nm}) do pré-inóculo foi aferida. Posteriormente, alíquotas do pré-inóculo foram diluídas em 0 mL de meio de cultura LB, acrescido ou não de 50 μ g mL⁻¹ de canamicina até O.D._{600nm} inicial de 0,1. Em seguida, as culturas foram incubadas a 28°C em agitador orbital (140 rpm) e a OD foi aferida a cada 2 h nas primeiras 12 h de crescimento, e posteriormente às 24 h e 48 h após o início do crescimento. Os dados da curva de crescimento das linhagens selvagem e nocauteada foram submetidos à análise de correlação, utilizando o *software* R (R CORE TEAM, 2018).

5.2.6 Obtenção de *P. agglomerans* 33.1 nocauteada com vetor pCM88

Com a finalidade de certificar-nos de que a capacidade do endofítico *P. agglomerans* 33.1 de colonizar tecidos vegetais não havia sido alterada após o *knockout* do gene *rnc*, buscamos transformar células de *P.agg.33.1Δrnc* com o vetor pCM88, gentilmente cedido pela prof^a. Dra. Maria Carolina Quecine Verdi, do Departamento de Genética da ESALQ-USP, que permite expressão de GFP em bactérias e resistência à tetraciclina (Quecine *et al.*, 2016). Através da expressão de GFP em *P.agg.33.1Δrnc*, procuramos localizá-la nos tecidos de cana-de-açúcar após a colonização utilizando microscopia confocal para confirmar sua capacidade de colonização do hospedeiro vegetal após *knockout* gênico.

Células eletrocompetentes de *P.agg.33.1Δrnc* foram obtidas. Uma cultura bacteriana em 5 mL de meio LB líquido com 50 mg L⁻¹ de canamicina foi incubada a 28°C por 18 h a 150 rpm. Após o crescimento, 1 mL da cultura foi transferido para 50 mL de LB e incubados a 28°C a 180 rpm até atingir uma O.D._{600nm} = 0,7. Em seguida, o meio foi centrifugado a 3.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em água deionizada esterilizada e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado, o sedimento de células bacterianas ressuspenso em 10% glicerol, centrifugado para diluição de 500X e distribuídos em alíquotas de 100 µl para estocagem a -80°C até o momento da transformação.

Posteriormente, cerca de 500 ng do vetor pCM88 foi adicionado a 100 µL da células eletrocompetente de *P.agg.33.1Δrnc* para eletroporação (*Gene Pulser*, BioRad, -2,5kV, 25µF, 200Ω, cubetas de 0,2 cm). As células eletroporadas foram então plaqueadas em meio sólido LB contendo 12,5 mg mL⁻¹ de tetraciclina e incubadas por 18h a 28°C. Os clones foram repicados em meio LB líquido com o mesmo antibiótico a 28°C por 48h em agitação de 120 rpm. Após este período, as bactérias transformadas foram observadas por meio da emissão de fluorescência verde em microscópio confocal (*Confocal Microscope C2+ Ti-U*, Nikon).

5.2.7 Avaliação da capacidade de colonização endofítica de *P. agglomerans* 33.1Δrnc em plântulas de cana-de-açúcar - Microscopia Confocal

Plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) *in vitro* foram gentilmente cedidas pela Dra. Silvana Creste, do Centro de Cana do IAC-APTA, Ribeirão Preto, SP. As plantas micropropagadas utilizadas eram da cultivar 'IACCTC05-8069' e estavam em estágio F3 na cultura *in vitro* (Figura 2).



Figura 2. (A) Biorreatores com plântulas de cana-de-açúcar dos genótipos IACSP01-5503 e IACCTC05-8069, cedidos pelo Centro de Cana do IAC-APTA, Ribeirão Preto, SP. (B) Plântulas de cana-de-açúcar sendo multiplicadas *in vitro*.

A colonização das plantas micropropagadas de cana-de-açúcar foi avaliada utilizando-se as linhagens selvagem, *P. agglomerans* 33.1 WT, e a nocauteada, *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc*, ambas transformadas com o plasmídeo pCM88 para expressão de GFP. As linhagens bacterianas foram cultivadas até a fase *log* de crescimento em meio LB (com presença de tetraciclina 12,5 mg mL⁻¹) e então adicionadas a taxa de 10⁸ UFC mL⁻¹, em meio MS contendo as plantas micropropagadas. O tratamento controle consistiu na adição de meio de cultura LB sem bactérias. Todas as amostras foram incubadas a 28°C em sala com fotoperíodo controlado de 16 h de luz. Então, o material vegetal proveniente deste ensaio foi utilizado para realização de cortes longitudinais de tecidos radiculares e caulinares, os quais foram dispostos em lâmina com água e visualizados imediatamente em microscópio confocal. A presença da bactéria endofítica no interior dos tecidos vegetais foi constatada pela observação da emissão de fluorescência verde contrastantes entre inoculado e controle. Foram utilizadas três amostras para cada tratamento após 6 dias da inoculação das plântulas com a bactéria.

5.2.8 Avaliação da capacidade de colonização endofítica de *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* em plântulas de cana-de-açúcar - Isolamento do microrganismo a partir do hospedeiro vegetal

Outra maneira de verificar a eficiência de colonização da linhagem bacteriana *P.agg.33.1* Δ *rnc* em plantas de cana-de-açúcar foi por meio do re-isolamento a partir do tecido vegetal colonizado. Para tanto, foi realizado um novo experimento idêntico ao interior, inoculando 10⁸ UFC mL⁻¹ crescida em meio de cultura LB líquido, em meio MS contendo as plantas micropropagadas (Figura 3). Foram utilizados três tratamentos com 3 repetições /

plantas: adição de meio de cultura LB (controle); adição de meio de cultura LB contendo *P. agglomerans* 33.1: pCM88 (WT); e adição de meio de cultura LB contendo a linhagem *P.agg.33.1Δrnc*: pCM88 (K1).



Figura 3. Plantas micro propagadas de cana-de-açúcar utilizadas no experimento de inoculação pela bactéria endofítica *Pantoea agglomerans* 33.1 selvagem (WT) e *Pantoea agglomerans* 33.1 com o gene *rnc* editado (K1), a fim de caracterizar sua capacidade de colonização após o knockout gênico.

Seis e 12 dias após a inoculação (6 DAI e 12 DAI) das plantas com as bactérias, o material foi utilizado para o isolamento. A massa de raiz e parte aérea de cada amostra das plantas / repetições dos três tratamentos (controle, WT e K1) foi estimada. Em seguida, a superfície das raízes e parte aérea foram previamente desinfetadas por lavagem em 70% etanol por 1 min, solução de hipoclorito de sódio comercial (2% de Cl disponível) por 30 s e 70% etanol por 30 s, seguidos por lavagem em água destilada estéril por 1 min. Para confirmar que o processo de desinfecção foi bem-sucedido, foram espalhadas em placas contendo médio LB sólido, alíquotas da água destilada estéril usada no enxágue final e as placas foram examinadas quanto ao crescimento após a incubação a 28°C por 5 d. Após a desinfecção, o material vegetal foi macerado na presença de 1 mL – 5 mL de tampão PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ e 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4), sendo utilizado 1 mL de PBS g⁻¹ de material vegetal, e incubados por 30 min a 28 °C. Após a obtenção da suspensão de microrganismos, 100 µL foram espalhados sobre meio LB suplementado com tetraciclina (100 µg.mL⁻¹) correspondendo a diluição 10⁰. Foram realizadas diluições seriadas 10⁻¹ e 10⁻², em tampão PBS, e alíquotas de 100 µL de cada diluição foram espalhadas sobre meio LB suplementado com tetraciclina (100 µg mL⁻¹) e incubados a 28°C por 3 d para o

isolamento nos tempos 6 DAI e 12 DAI. No caso do isolamento 12 DAI, foi realizada uma diluição adicional de 10^{-3} . Para ambos os isolamentos, foram utilizadas três repetições / plantas de cada tratamento e para cada diluição, foram utilizadas duplicatas de placas. Os dados de densidade bacteriana (UFC grama de amostra⁻¹) foram analisados estatisticamente por meio de uma análise de variância (ANOVA) seguida por um teste de comparação de médias de Tukey, a um nível de significância de 5%, utilizando o software R (R Core Team, 2017).

5.2.9 Avaliação da capacidade de promoção do crescimento vegetal de *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* em plântulas de cana-de-açúcar

Sabendo que o endofítico *P. agglomerans* 33.1 é classificado como uma bactéria promotora do crescimento vegetal, procuramos verificar se esta capacidade de beneficiar seu hospedeiro vegetal se manteve após o *knockout* do gene *rnc*, ou ainda, averiguar se o nocaute do gene não afetou esta característica. Desta forma, foi realizado um experimento idêntico ao apresentado acima, contendo desta vez oito repetições / plantas por tratamento. As plantas foram então deixadas em sala de crescimento com temperatura de 28°C e fotoperíodo de 16 h de luz por 45 dias.

As raízes de cada uma das plantas foram então separadas da parte aérea e ambos os tecidos submetidos à secagem em estufa de circulação de ar a 60°C por 48 h. Em seguida, o material foi pesado e realizou-se a análise estatística a fim de comparar o peso de matéria seca dos diferentes materiais no *software* estatístico R (R Core Team, 2017). Após a ANOVA, o teste de comparação múltipla de médias entre os tratamentos utilizado foi o de Tukey. O nível de significância adotado no teste foi de 5% (p valor < 0,05).

5.2.10 Transformação de *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* com vetor para expressão de dsRNA

Buscando comprovar que o *knockout* do gene *rnc* de *P. agglomerans* 33.1 resulta na não-degradação de dsRNA e consequentemente, viabilizaria o acúmulo pelo microrganismo, realizamos a transformação de *P.agg.33.1 Δ *rnc** com o vetor *pdag: GFP*, para expressão de moléculas de dsRNA contra o gene *GFP*, fornecido pelo Prof. Paul Dyson. O vetor *pdag* possui região com dois promotores *P_{tac}* convergentes, intermediados pela sequência do gene *GFP* e do gene *dag*, idealizado para produção de moléculas de dsRNA, tanto contra a sequência do gene *GFP* (dsGFP), como do gene *dag* (ds*dag*), que codifica diacilglicerol quinase.

Assim uma alíquota do vetor *pdag* (1,3 μ L) foi utilizada para transformação de células eletrocompetentes de *E. coli* TOP 10 utilizando o eletroporador *Gene Pulser* (BioRad, -2,5kV, 25 μ F, 200 Ω , cubetas de 0,2 cm). Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB contendo 100 mg L⁻¹ de ampicilina. As placas foram mantidas a 37°C por 16 h. Em seguida, as bactérias foram crescidas em meio LB líquido contendo 100 mg L⁻¹ de ampicilina, a 37°C por 16 h, sob agitação. A confirmação da transformação procedeu-se através da minipreparação plasmidial seguida de digestão com enzimas de restrição *Xba*I. A miniprep dos transformantes positivos foi utilizada para eletroporação de células competentes de *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc*. Células competentes de *P. agglomerans* 33.1 WT também foram transformadas com a construção como controle negativo. Foram utilizados 0,9 μ L de miniprep e utilizamos o eletroporador *Gene Pulser* (BioRad, -2,5kV, 25 μ F, 200 Ω , cubetas de 0,2 cm). Após transformadas, as bactérias foram plaqueadas em meio LB contendo 100 mg L⁻¹ de ampicilina (antibiótico de seleção do vetor) e 50 mg L⁻¹ de canamicina (gene que interrompe o gene *rnc* na bactéria nocauteada) para seleção das bactérias transformantes. Após 48 h crescendo a 28°C, as colônias foram colocadas para crescer novamente a 28°C em meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos, sob agitação. Então, foram submetidas à minipreparação plasmidial e digestão com enzima de restrição para confirmação da transformação.

5.2.11 Extração de dsRNA de *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc*

Os clones positivos de *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* contendo o vetor *pdag-GFP* e *P. agglomerans* 33.1 WT transformada com o mesmo vetor que a linhagem com *knockout* gênico, *pdag: GFP* foram colocados para crescer em meio LB líquido com 100 mg L⁻¹ de ampicilina e 50 mg L⁻¹ de canamicina, por 48 h a 28°C sob agitação. Após esse período, 2 mL do meio de cultura contendo as bactérias foram coletados em microtubos e centrifugados a 10.000 g por 2 min. Em seguida, o *pellet* bacteriano foi utilizado para extração de dsRNA e confirmação da produção desta molécula.

O processo de extração de dsRNA utilizado foi o mesmo descrito por Timmons *et al.* (2001). Ao tubo de microcentrífuga contendo o *pellet* de bactéria, foi adicionado 800 μ L de solução 1 M de acetato de amônio / 10 mM de EDTA e 800 μ L de Fenol: CIA (25:24:1). As amostras foram incubadas a 65°C por 30 min. Em seguida, a fase sobrenadante foi coletada e transferida para um novo microtubo. O volume equivalente à fase sobrenadante coletada foi adicionado de isopropanol e, as amostras foram incubadas a -20°C *overnight*, centrifugadas a 10.000 g por 30 min a 4°C, e o *pellet* foi seco. O *pellet* foi então resuspenso em 10 μ L em

tampão de extração pH 7,5. As amostras foram então tratadas com DNaseI (Invitrogen). O dsRNA presente nas amostras foi então observado por eletroforese em gel de 2% agarose em tampão TAE.

5.2.12 Transformação de *P. agglomerans* 33.1 Δ rnc com vetor para expressar dsRNA contra um gene-alvo do inseto: obtendo o vetor

Uma alíquota do vetor pdag foi utilizada para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP 10 com *Gene Pulser* (BioRad, -2,5kV, 25 μ F, 200 Ω , cubetas de 0,2 cm), para obtenção de estoque do vetor. Após transformadas, as bactérias foram plaqueadas em meio LB contendo 100 mg L⁻¹ de ampicilina para seleção das bactérias transformantes. Em seguida, algumas colônias isoladas foram selecionadas para crescer em meio LB líquido contendo antibiótico por 16 h a 37°C sob agitação. Depois, realizou-se a minipreparação plasmidial e a digestão com *RsaI* para confirmação dos clones positivos. Suas respectivas minipreps foram utilizadas na digestão com *XbaI* para linearização do vetor. A banda do gel referente ao vetor linearizado foi então recortada e purificada com o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

5.2.13 Geração da construção pdag: *Ds_up56*

Foi realizada então a amplificação do gene-alvo *Ds_up56* de *D. saccharalis*, que codifica a enzima REase neste inseto utilizando *primers* contendo na extremidade *forward* o sítio de *XbaI* (CTTAGTCTAGATTGGCGACATTTATTCTTTT; AATACCCAAAGAGAGGAAC; tamanho do amplicon: 461 pb), a fim de facilitar a ligação do inserto ao plasmídeo de destino pdag. A reação de amplificação foi realizada contendo cerca de 100 ng do mix de cDNA de lagartas de todos os instares do inseto (1° ao 6° instar), 1,5 mM de MgCl₂, 100 μ M de cada dNTP, 0,1 μ M de cada *primer* e 2 U de *Taq* polimerase em tampão de (NH₄)₂SO₄ em volume final de 25 μ L. As condições do termociclador foram 95°C por 2 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 56°C por 40 s, 72° por 40 s, com 72°C por 5 min de extensão final. As reações foram submetidas à eletroforese em gel 1% agarose em tampão TAE e os fragmentos de interesse foram extraídos do gel e purificados com o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

A reação de amplificação do gene-alvo foi digerida com *XbaI*, a fim de gerar bordas coesivas complementares para a ligação do inserto em questão ao vetor de interesse, o pdag. Da mesma forma, o vetor pdag também foi digerido com a mesma enzima. Foi conduzida a reação de ligação do gene-alvo *Ds_up56* de *D. saccharalis* ao vetor de silenciamento pdag

utilizando T4 DNA ligase (Invitrogen). Posteriormente, realizamos a transformação por eletroporação de células competentes de *E. coli* TOP 10, seguida de plaqueamento em meio LB com 100 mg mL⁻¹ de ampicilina, as quais foram mantidas a 37°C durante 16 h. Após este período, colônias bacterianas individuais foram repicadas em meio LB líquido contendo 100 mg mL⁻¹ de ampicilina e mantidas a 37°C durante 16 h, sob agitação. A minipreparação plasmidial foi realizada e a confirmação das colônias transformadas foi realizada por meio de uma dupla digestão com as enzimas *LguI* e *XhoI*.

5.2.14 Transformação de *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* com vetor para expressar dsRNA contra um gene-alvo do inseto: ligação do inserto ao vetor

Uma vez confirmados os clones positivos de *E. coli* TOP 10 para p_{dag}: *Ds_up56*, utilizamos suas respectivas minipreps para transformar células de *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* e assim, obter *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* expressando dsRNA contra *Ds_up56* (*dsDs_up56*). Além disso, células competentes de *P. agglomerans* 33.1 WT também foram transformadas com a mesma construção, para servirem como controle negativo da expressão de dsRNA pelo endofítico. Foram utilizados 0,9 μ L de miniprep e o eletroporador *Gene Pulser* (BioRad, -2,5kV, 25 μ F, 200 Ω , cubetas de 0,2 cm). Após transformadas, as bactérias foram plaqueadas em meio LB contendo 100 mg L⁻¹ ampicilina (antibiótico de seleção do vetor) e 50 mg L⁻¹ canamicina (gene que interrompe o gene *rnc* na bactéria nocauteada) para seleção das bactérias transformantes, que foram confirmadas por PCR de colônia. Para isto, após 48 h crescendo a 28°C, as colônias foram cultivadas separadamente em placas de meio LB sólido com 50 mg mL⁻¹ de canamicina a 28°C por 16 h. Em seguida, algumas colônias foram inoculadas individualmente em 4 mL de meio LB líquido acrescentado de 50 mg mL⁻¹ de canamicina, sob agitação de 130 rpm por 16 h à 28°C. Um μ L de cultura bacteriana foi coletado e transferido para microtubo, contendo 9 μ L de água deionizada autoclavada. Em seguida, os microtubos foram colocados em termociclador Veriti (Applied Biosystems) a 95°C por 10 min. As reações de PCR foram realizadas com *primers* específicos do gene *Ds_up56* (CTTAGTCTAGATTGGCGACATTTATTCTTTT; AATACCCAAAGAGAGGAACA; tamanho do amplicon: 461 pb). Na sequência, foram acrescentados aos microtubos os componentes da reação de PCR para um volume final de 25 μ L de reação: 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 μ M de cada *primer*, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas) e tampão (NH₄)₂SO₄. A amplificação foi realizada em termociclador, empregando as seguintes condições térmicas: 94°C por 45 s, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C por 45 s e 72°C por 30 s, finalizando à 72°C por 7 min. Em

seguida as amplificações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE.

5.2.15 Extração de dsDs_up56 de *P. agglomerans* 33.1Δrnc

Uma vez confirmados os clones positivos de *P. agglomerans* 33.1Δrnc contendo a construção pdag: *Ds_up56*, estes foram crescidos em meio LB líquido com 100 mg L⁻¹ de ampicilina e 50 mg L⁻¹ de canamicina por 48 h a 28°C sob agitação. Após esse período, 2 mL do meio de cultura contendo as bactérias foram centrifugados a 10.000 g por 2 min. O *pellet* bacteriano foi utilizado para extração de dsRNA e confirmação da produção desta molécula. O processo de extração de dsRNA utilizado foi o mesmo descrito por Timmons *et al.* (2001), descrito acima. Após a extração, as amostras foram tratadas com DNaseI (Invitrogen). O dsRNA foi então observado por eletroforese em gel de 2% agarose em tampão TAE corado com brometo. Novamente, o controle negativo da expressão de dsRNA foi a amostra extraída de *P. agglomerans* 33.1 WT transformada pdag: *Ds_up56*.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Identificação e análise filogenética da cepa bacteriana *P. agglomerans* 33.1

Para confirmar a identidade da cepa bacteriana de *P. agglomerans* 33.1 foi realizada a amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA de *P. agglomerans* 33.1 (GenBank: NZ_CP083809.1). Foi realizada a comparação desta sequência com demais organismos próximos, haja visto que esta linhagem de estudo não possui genoma sequenciado, por meio de *BLASTn* no NCBI. Nesta análise, foram encontrados *hits* correspondentes a sequências do 16S rRNA de espécies como *P. agglomerans strain* YTGR1, *P. agglomerans strain* TGJ2, *P. agglomerans strain* DLYTGB1, *P. agglomerans strain* FDAARGOS_160, *P. agglomerans strain* VRGB-40, *P. agglomerans strain* SXD. Todas elas apresentaram valores de identidade e cobertura igual a 98%. Além destas, também houve semelhanças com algumas linhagens das espécies *P. ananatis* e *P. septica*, porém com identidade e coberturas ligeiramente menores, entre 96% e 97%.

A sequência 16S rRNA de *P. agglomerans* 33.1 foi então utilizada para a análise de filogenia. Na análise, foram utilizadas sequências obtidas com o *BLASTn* (NCBI) e que apresentavam maior homologia e duas sequências escolhida intencionalmente: 16S rRNA de *E. coli* K-12 substr. MG1655 e 16S rRNA de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis strain* 168. A escolha da primeira sequência justifica-se pela comprovada estreita relação entre as duas espécies. O fundamento para escolha da segunda sequência, por sua vez, foi para evidenciar

distâncias evolutivas maiores, posto que *B. subtilis*, pertencente à família Bacillaceae, é notadamente bastante distinto de enterobactérias como *E. coli* e *P. agglomerans*.

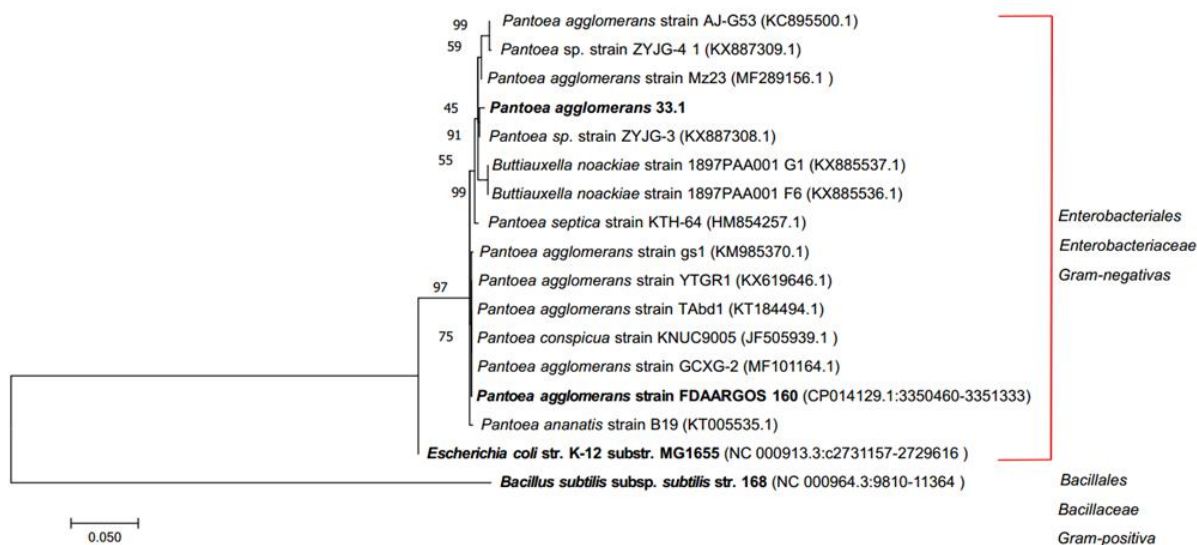


Figura 4. Análise filogenética por método de máxima probabilidade. A árvore foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança com base no modelo Kimura de 2. Valores de *bootstrap* são mostrados ao lado dos ramos. A árvore foi obtida usando a abordagem Máxima Verossimilhança (*Maximum Composite Likelihood - MCL*) e, em seguida, selecionando a topologia com um valor superior de log de verossimilhança. Uma distribuição discreta *Gamma* foi utilizada para modelar as diferentes taxas evolutivas entre os organismos. A árvore é desenhada para escala, com comprimentos de ramificação medidos no número de substituições por site. A análise envolveu 17 sequências de nucleotídeos. Todas as posições que continham lacunas e dados perdidos foram eliminadas. Houve um total de 852 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas em MEGA7. Os números apresentados entre parênteses compreendem o acesso das entradas no NCBI.

A análise indicou a elevada proximidade de *P. agglomerans* 33.1 com demais isolados da espécie *P. agglomerans*, bem como com outras espécies do gênero *Pantoea*, tais como *P. septica*, *P. ananatis* e *P. conspícua*. Essa íntima relação é evidenciada pelos curtos braços da árvore, algumas vezes quase que inexistentes, demonstrando a baixa distância evolutiva entre os organismos, ou ainda, a intensa relação existente entre eles (Figura 4). Também pode ser observado que, embora um pouco maior que os braços que interligam espécies de *Pantoea*, o braço referente à *E. coli* possui uma distância significativamente curta. Isso sugere que *P. agglomerans* 33.1 e *E. coli* strain K-12 substrat. MG1655 constituem-se espécies estreitamente relacionadas, ou ainda, próximas evolutivamente. Contrariamente, nota-se que a distância do braço correspondente ao organismo *B. subtilis* subsp. *subtilis* strain 168 é muito maior com relação aos demais, anunciando, portanto, a maior distância evolutiva e pouca proximidade entre as espécies listadas. A partir disto, faz-se possível o uso das informações disponíveis para proteínas de *E. coli* strain K-12, especificamente a de interesse deste

trabalho, ou seja, a RNaseIII, como referência para o estudo e caracterização da RNaseIII de *P. agglomerans* 33.1.

5.3.2. Caracterização e anotação funcional da RNaseIII de *P. agglomerans* 33.1 (Pa-RNaseIII) por análise genômica comparativa

Com a finalidade de validar que a sequência em estudo obtida via amplificação do gene *rnc* de *P. agglomerans* 33.1 se tratava de uma proteína da família RNaseIII, foi realizada a comparação desta sequência com demais organismos, e constatou-se que se referia a uma proteína deste tipo, com uma identidade de aminoácidos de 97,8% com a sequência proteica da RNaseIII de *P. ananatis* e de 92,48% com a sequência da RNaseIII de *E. coli* (Figura 5).

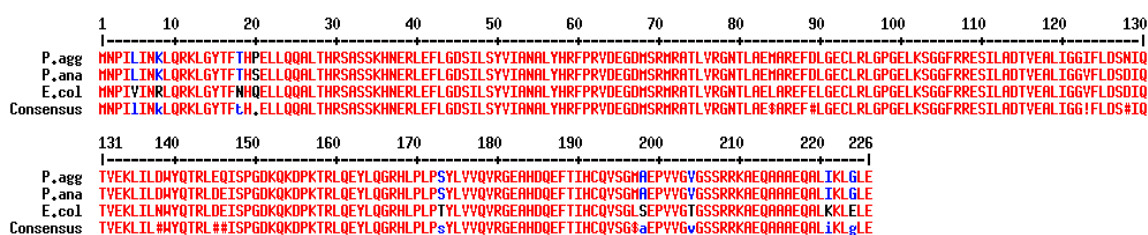


Figura 5. Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína RNaseIII proveniente da amplificação do gene *rnc* de *Pantoea agglomerans* 33.1 com sequências proteicas de outras espécies para confirmação de identidade.

Buscando caracterizar e realizar a anotação funcional por genômica comparativa da sequência de aminoácidos da proteína Pa-RNaseIII, foi utilizado o *software* ProtParam para analisar as propriedades físico-químicas desta proteína. Foi predito que a proteína é composta por 226 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 25 kDa, assim como a RNaseIII encontrada em *E. coli* (Nashimoto & Uchida, 1985). O ponto isoelétrico (pI) encontrado foi 6,67 e número total de resíduos negativos (Ácido aspártico + Ácido glutâmico) e positivos (Arginina + Lisina) igual a 29 e 28, respectivamente. O valor de pI calculado indicou que a proteína é carregada negativamente e possui caráter ácido (pI < 7). O valor do índice de instabilidade (II) obtido foi de 49,94, o que sugere que a proteína seja previsivelmente instável (II > 40) (Guruprasad *et al.*, 1990). Com relação ao índice alifático (IA), o mesmo apresentou um valor muito elevado, de 94,96, indicando alta termoestabilidade da proteína (Ikai, 1980). O valor estimado de meia-vida foi >10h em *E. coli* (*in vivo*). O valor GRAVY encontrado foi negativo e igual a -0,359, sendo, portanto, um indicativo de que a proteína é solúvel em água e hidrofílica, e sendo também bastante próximo ao valor GRAVY da RNaseIII de *E. coli*, que é igual a -0,449. A análise de composição de aminoácidos revelou quantidades elevadas de leucina (13,3%), ácido glutâmico (8,4%), arginina (8,0%) e glicina

(8,0%). Os aminoácidos encontrados em menor proporção foram triptofano (0,4%) e cisteína (0,9%) (Tabela 2). A fórmula molecular da proteína Pa-RNaseIII encontrada, com base na composição atômica, foi $C_{1121}H_{1807}N_{325}O_{335}S_7$.

Tabela 9. Composição de aminoácidos da proteína RNaseIII de *Pantoea agglomerans* 33.1.

Aminoácido	N ¹	% ²	Aminoácido	N ¹	% ²
Alanina	16	7,1	Lisina	10	4,4
Arginina	18	8,0	Metionina	5	2,2
Asparagina	6	2,7	Fenilalanina	7	3,1
Ácido aspártico	10	4,4	Prolina	9	4,0
Cisteína	2	0,9	Serina	14	6,2
Glutamina	14	6,2	Treonina	10	4,4
Ácido glutâmico	19	8,4	Triptofano	1	0,4
Glicina	18	8,0	Tirosina	6	2,7
Histidina	7	3,1	Valina	12	5,3
Isoleucina	12	5,3	Pirrolisina	0	0,0
Leucina	30	13,3	Selenocisteína	0	0,0

1. N representa o número total.

2. % representa a porcentagem numérica de cada aminoácido.

A estrutura secundária da proteína foi inicialmente predita pelo servidor SOPMA. Verificou-se que a alfa-hélice (“*helix*”) é o tipo de estrutura predominante nesta proteína (51,5%), compreendendo em número absoluto, um total de nove alfa-hélices distribuídas ao longo da sequência de aminoácidos (Figura 6A). Também foi encontrada uma porcentagem de 19,8% de fita beta (“*strand*”), as quais se unem por meio de ligações de hidrogênio para formar as folhas-beta (Figura 6A). O número absoluto deste tipo de estrutura encontrado foi igual a três. Por último, constatou-se que sequências de aminoácidos que não assumem nem estrutura alfa-helicoidal nem folha-beta, denominadas de “*random coil*”, representam um percentual de 28,63% da estrutura secundária da Pa-RNaseIII (Figura 6A). Estas estruturas compreendem uma espiral que se espalha aleatoriamente no espaço tridimensional, na qual a conformação de cada resíduo de aminoácido é independente das conformações de resíduos vizinhos (Baldwin & Zimm, 2000). Resultados similares foram encontrados pela plataforma PSIPRED e *PredictProtein* e são semelhantes aos que são encontrados também para RNaseIII de *E.coli*. A representação da estrutura secundária da Pa-RNaseIII obtida pelo servidor PSIPRED é apresentada na Figura 6 A e B.

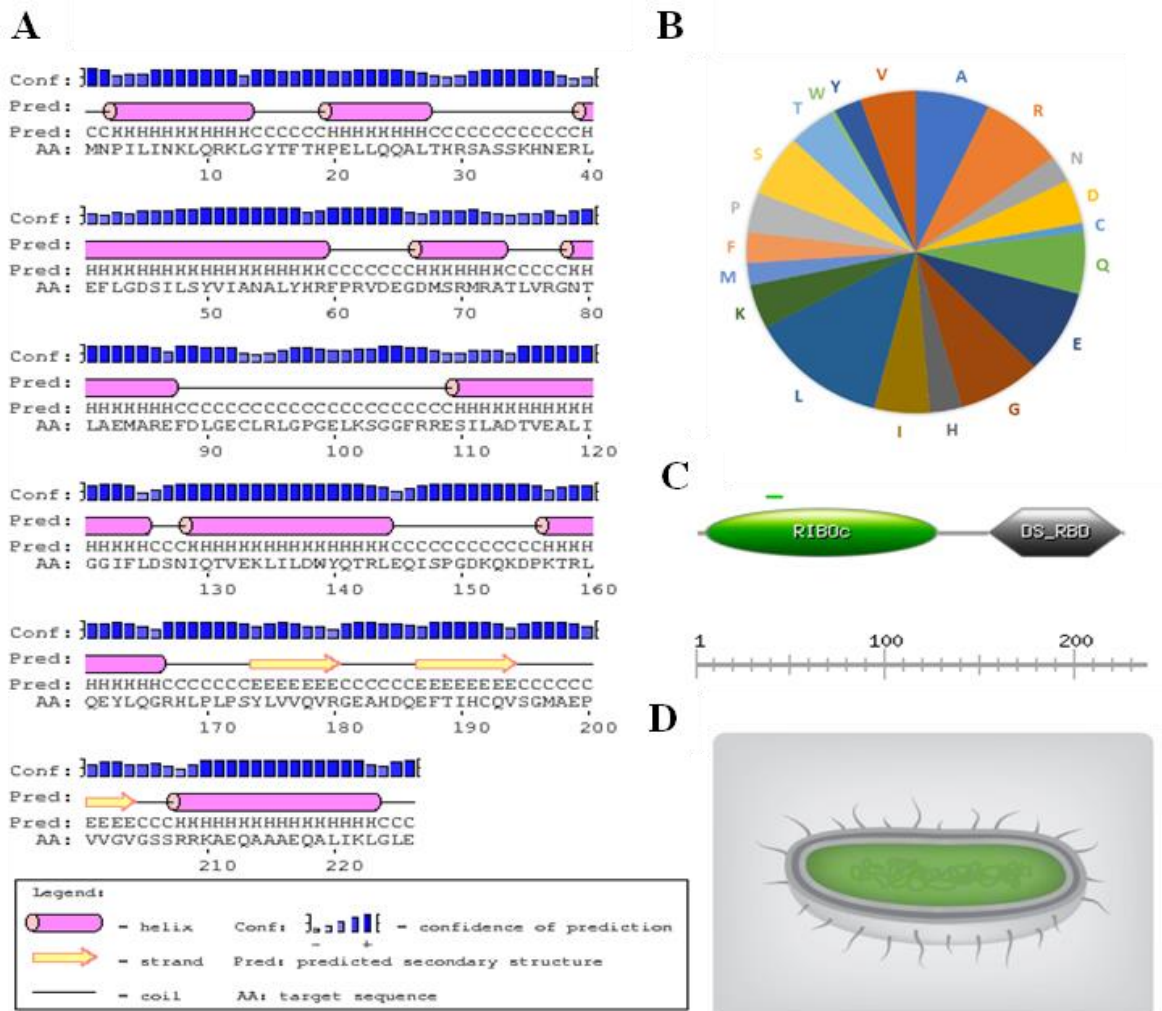


Figura 6. (A) Estrutura secundária predita da proteína RNaseIII de *Pantoea agglomerans* 33.1 (Pa-RNaseIII) pelo servidor PSIPRED, com presença exclusiva de nove alfa-hélices (cilindros em rosa) e três folhas-beta (setas em amarelo). (B) Gráfico demonstrando a composição de aminoácidos da sequência proteica Pa-RNaseIII. (C) Domínios preditos para a proteína Pa-RNaseIII, através da ferramenta MyDomains (PROSITE). Em verde, apresentado o domínio endonuclease RIBOc e, em cinza, a representação do domínio de ligação ao dsRNA, o DS_RBD. O traço em verde, posicionado na região N-terminal, encontra-se a assinatura constituída por 9 aminoácidos conservados, característicos das proteínas pertencentes à família ribonuclease III. (D) Localização preditiva para Pa-RNaseIII: o citoplasma (termo *GO*: 0005737) (AmiGO), com previsão de confiança igual a 91%, obtido através do software PredictProtein.

A proteína Pa-RNaseIII também foi classificada de acordo com a análise realizada no *software* InterPro, como pertencente à família Ribonuclease III (IPR011907), assim como esperado. De acordo com a descrição, esta família é formada por enzimas ribonucleases III (RNaseIII), que clivam especificamente RNA dupla-fita (dsRNA) e estão presentes tanto em bactérias como em organismos eucariotos (Conrad & Rauhut, (2002). Em bactérias, seu papel principal é o processamento de precursores de moléculas de rRNA (pré-rRNAs), onde o pré-rRNA é clivado em locais específicos para produzir os precursores imediatos das moléculas funcionais. RNaseIII também pode atuar na maturação e degradação de mRNAs, e na maturação de tRNAs (Takiff *et al.*, 1989; Wang & Bechhofer, 1997; Rauhut *et al.*, 1996). Em

alguns organismos (por exemplo, *E. coli*), as células são viáveis sem esta enzima, embora elas tenham seu crescimento levemente diminuído, mas em outros (por ex., *B. subtilis* e *Mycoplasma genitalium*) esta enzima é essencial (Conrad & Rauhut, 2002). De acordo ainda com a descrição para esta família no InterPro, de maneira geral, esta enzima caracteriza-se por apresentar dois domínios peculiares: o domínio endonuclease, localizado na região N-terminal da proteína, contendo diversas alfa-hélices, mas nenhuma fita-beta, e o domínio de ligação ao RNA dupla-fita, encontrado na região C-terminal da proteína, formado pelo dobramento alfa-beta(3)-alfa, comum às proteínas de ligação a dsRNA. Além disso, outra característica da sequência desta proteína é presença de uma assinatura composta por 9 aminoácidos conservados encontrados na região N-terminal da RNaseIII (Wu *et al.*, 2000), os quais puderam ser observados na RNaseIII de *P. agglomerans* 33.1 (Figura 6C).

Quando analisamos a sequência da Pa-RNaseIII quanto à predição de seus possíveis domínios, com a utilização do InterPro, os resultados foram extremamente correspondentes aos relatados acima, na descrição da família das enzimas ribonucleases III. Isso corrobora que a proteína estudada pertenceria a esta família e assumiria as funções descritas. Com relação ao domínio endonuclease identificado para a Pa-RNaseIII, o mesmo foi nomeado aqui como RIBOc. Ele compreende os aminoácidos 6 a 128 da sequência proteica, encontra-se na região N-terminal da proteína e seu número de acesso a banco de dados é PS50142. O domínio de ligação ao dsRNA, foi mencionado neste trabalho como DS_RBD. Ele inclui os aminoácidos 155 a 225, localiza-se na região C-terminal da proteína e seu número de acesso é PS50137. Por último, a assinatura encontrada contém 9 aminoácidos conservados (38 ao 46), está posicionada na região N-terminal, seu número de acesso é PS00517 e na figura ilustrativa está indicada pelo traço verde (Figura 6C).

É importante perceber que a conformação da estrutura secundária da proteína Pa-RNaseIII predita, junto com os domínios determinados, está de acordo com o descrito para proteínas da família Ribonuclease III (Conrad & Rauhut, 2002; Akey & Berger 2005; Blaszczyk *et al.*, 2021). Isto é, segundo a descrição das características da família das enzimas RNaseIII, contida no InterPro, o domínio endonuclease é composto apenas por estruturas alfa-hélices, mais precisamente, sete delas. Por outro lado, o domínio de ligação ao dsRNA exibe a topologia alfa-hélice, três fitas-beta e outra alfa-hélice ($\alpha\beta\beta\beta\alpha$) (Robertson *et al.*, 1968), exatamente igual aos resultados encontrados neste trabalho (Figura 6B).

Quanto à atribuição de termos *GO*, a eleição da sequência da proteína RNaseIII de *E.coli*, para transferência dos termos à Pa-RNaseIII, se deu devido à identidade de 92% encontrada entre as duas sequências e à cobertura de alinhamento igual a 100%, validando a

homologia e a elevada similaridade entre as duas sequências, e indicando a conservação da proteína RNaseIII. Além disso, foi verificado que a enzima RNaseIII de *E. coli* possui exatamente os mesmos domínios funcionais que a Pa-RNaseIII, apontando a elevada similaridade estrutural e funcional entre elas (Figura 7) (Robertson *et al.*, 1968; Saleh *et al.*, 2004; van Rij *et al.*, 2006; Blaszczyk *et al.*, 2004). Os termos *GO* então atribuídos à Pa-RNaseIII foram *double-stranded RNA binding* (*GO:0003725*), *RNA phosphodiester bond hydrolysis, endonucleolytic* (*GO:0090502*), *RNA processing* (*GO:0006396*), *ribonuclease III activity* (*GO:0004525*) e *cytosol* (*GO:0005829*) (Tabela 3).

<i>P. agq.</i>	MNPILINKLQKRLGYTFTHPELLQQALTHRSASSKHNERLEFLGDSILSYVIANALYHRF	60
<i>E. coli</i>	MNPIVINRLQKRLGYTFNHQELLQQALTHRSASSKHNERLEFLGDSILSYVIANALYHRF	60
	****;*:*;*****.* *****	
<i>P. agq.</i>	PRVDEGDMSRMRATLVRGNTLAEMAREFDLGECLRLGPGELKSGGFRRESILADTVEALI	120
<i>E. coli</i>	PRVDEGDMSRMRATLVRGNTLAELAREFELGECLRLGPGELKSGGFRRESILADTVEALI	120
	*****:*****:*****	
<i>P. agq.</i>	GGIFLDSNIQTVEKLILDWYQTRLEQISPGDKQKDPKTRLQEYLQGRHLPPLSYLVVQVR	180
<i>E. coli</i>	GGVFLDSNIQTVEKLILNWIYQTRLDEISPGDKQKDPKTRLQEYLQGRHLPPLTYLVVQVR	180
	:;*****:*****:*****:*****:*****	
<i>P. agq.</i>	GEAHDQEFTIHCQVSGMAEPVVGSSRRKAEQAAAEQALIKLGL	226
<i>E. coli</i>	GEAHDQEFTIHCQVSGMLSEPVVGTGSSRRKAEQAAAEQALKKLELE	226
	*****:*****.***** ** **	

Figura 7. Alinhamento entre as sequências das proteínas RNaseIII de *Pantoea agglomerans* 33.1 e *Escherichia coli* (acesso no Uniprot: P0A7Y0), realizado com a ferramenta *Clustal Omega*, indicando elevada similaridade entre as duas sequências, bem como alta identidade e consequentemente, existência de homologia entre elas. A figura ilustra, ainda, os domínios funcionais de ambas as sequências de aminoácidos, os quais se apresentam bastante conservados, sugerindo a semelhança de função entre as proteínas das duas bactérias. Destacado em verde está o domínio RIBOc (domínio endonuclease) e em cinza, o DS_RBD (domínio de ligação ao dsRNA).

Tabela 10. Descrição dos termos GO atribuídos à sequência proteica da RNaseIII de *Pantoea agglomerans* 33.1.

Nome	ID	Ontologia	Definição
<i>double-stranded RNA binding</i>	GO:0003725	Função Molecular	Catálise da clivagem endonucleolítica de RNA com terminações 5'-fosfoésteres e 3'-OH; faz dois cortes escalonados em ambas as fitas de dsRNA, deixando uma saliência de 2 a 3 nucleotídeos
<i>ribonuclease III activity</i>	GO:0004525	Função Molecular	Catálise da clivagem endonucleolítica de RNA com terminações 5'-fosfoésteres e 3'-OH; faz dois cortes escalonados em ambas as fitas de dsRNA, deixando uma saliência de 2 a 3 nucleotídeos
<i>RNA phosphodiester bond hydrolysis, endonucleolytic</i>	GO:0090502	Processo biológico	As reações químicas e vias envolvendo a hidrólise de ligações 3', 5'-fosfodiéster internas, em uma ou duas fitas de ribonucleotídeos
<i>RNA processing</i>	GO:0006396	Processo biológico	Qualquer processo envolvido na conversão de um ou mais transcritos primários de RNA em uma ou mais moléculas de RNA maduras
<i>cytosol</i>	GO:0005829	Componente celular	A parte do citoplasma que não contém organelas, mas que contém outras partículas, tais como complexos de proteínas

Em *E. coli*, organismo para o qual a enzima RNaseIII foi descrita pela primeira vez, a primeira função descoberta para este polipeptídeo foi a atividade de degradar RNA dupla fita (dsRNA) (Robertson *et al.*, 1967). Depois, descobriu-se outra função, na realidade, a principal delas, que consiste no processamento do pré-rRNA. Durante a maturação do rRNA, a molécula precursora maior é clivada em posições discretas e altamente específicas, dando origem aos precursores imediatos das moléculas de rRNA maduras e funcionais (Bram *et al.*, 1980; Venema & Tollervey, 1999). Portanto, esta enzima cliva o transcrito primário do 30S rRNA para produzir os precursores imediatos dos 16S e 23S rRNAs. Esse corte pode ocorrer nas subunidades 30S, 50S e até mesmo na 70S, e é influenciada pela presença de proteínas ribossomais (Nashimoto & Uchida, 1985; Robertson *et al.*, 1968; Nikolaev *et al.*, 1974; Dunn, 1976; Gitelman & Apirion, 1980; Regnier & Grunberg-Manago, 1989). Além disso, a RNaseIII em bactérias, participa do processo de maturação de moléculas de mRNA e de alguns tRNAs (Regnier & Grunberg-Manago, 1990; Steege, 2000; Grunberg-Manago, 1999).

Pelos resultados de anotação funcional conferidos à Pa-RNaseIII, incluindo sua classificação em família, atribuição de domínios e termos *GO*, conjuntamente com a similaridade estrutural e também presença de homologia à RNaseIII de *E. coli*, bem como com a observação de se tratar de uma sequência proteica altamente conservada, podemos concluir que essas funções relatadas acima, já bastante estudadas e exploradas para a RNaseIII de *E. coli* podem ser aplicadas à RNaseIII de *P. agglomerans* 33.1.

5.3.3. *P. agglomerans* 33.1 com o gene *rnc* nocauteado

Bactérias endofíticas são microrganismos capazes de colonizar internamente o tecido da planta sem apresentar estrutura externa e sem causar prejuízo ao hospedeiro (Azevedo & Araújo, 2007), e poderiam ser identificadas e modificadas para serem utilizadas no controle de insetos-pragas (Rampelotti-Ferreira *et al.*, 2010; Quecine *et al.*, 2014). Quando associada às plantas, *P. agglomerans* já foi encontrada endofiticamente em inúmeras espécies, tais como, ervilha (Elvira-Recuenco & Van Vuurde, 2000), batata (Asis & AdaCHI, 2003), milho (Mcinroy & Kloepper, 1995), eucalipto (Procópio, 2004), laranja (Araújo *et al.*, 2002), soja (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004), arroz (Verma *et al.*, 2004), algodão (Mcinroy & Kloepper, 1995), trigo (Ruppel *et al.*, 1992), café (Vega *et al.*, 2005), feijão (Hsieh *et al.*, 2005) e cana-de-açúcar (Baldani *et al.*, 1986; Dong *et al.*, 1994; Loiret *et al.*, 2004).

P. agglomerans é vista como grande potencial devido à sua capacidade de promoção de crescimento vegetal por meio da solubilização de fosfato, produção de fitormônios e fixação biológica de nitrogênio (Loiret *et al.*, 2004; Sulbaran *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2001). Pode, ainda, combater vários fitopatógenos (Bonaterra *et al.*, 2003; Plaza *et al.*, 2004), bem como promover a indução de resistência sistêmica nas plantas colonizadas (Jeun *et al.*, 2004; Ongena *et al.*, 2000). Diante disto, avistou-se a possibilidade de utilizar este microrganismo endofítico, que coloniza tecidos de cana-de-açúcar, como método de entrega de dsRNA às lagartas de *D. saccharalis*.

As bactérias, assim como muitos eucariotos, possuem enzima(s) pertencente à família das ribonucleases, a RNaseIII, que desempenha diversas funções importantes no processamento de RNAs, além de proteger os organismos contra infecções virais. Neste último caso, para impedir a replicação do material genético do vírus invasor, a enzima atua na degradação de dsRNA (Langenberg *et al.*, 1997). No caso de *E. coli* HT115, linhagem amplamente utilizado em estudos de RNAi para controle de insetos, o gene *rnc* responsável pela produção da RNaseIII, foi nocauteado pela inserção de transposon $\Delta Tn10$ (Takiff *et al.*, 1989). Assim sendo, uma vez interrompido, o gene perde sua capacidade de codificar esta proteína e, conseqüentemente, não há degradação do dsRNA na célula bacteriana, aumentando a eficiência da técnica de RNAi, devido a maior quantidade de moléculas de dsRNA que serão acumuladas e entregues ao inseto alvo.

Desta maneira, realizamos o *knockout* do gene *rnc* de *P. agglomerans* 33.1, buscando tornar viável o seu uso como método de entrega de dsRNA às lagartas de *D. saccharalis*. Para isto, se utilizou o plasmídeo de recombinação pIJ790 para recombinação homóloga λ -Red a ser seguida (Whitten *et al.*, 2016). Em *E. coli*, por exemplo, a recombinação homóloga a partir

de fragmentos lineares de DNA é dificultada pela presença nesta célula de enzimas exonucleases que degradam este tipo de molécula (Lorenz, 1994). Muitos bacteriófagos possuem seus próprios sistemas de recombinação homóloga. A recombinase λ -Red é um destes sistemas, sendo constituída pelos genes α , β e exo . O gene α codifica para uma proteína que inibe a exonuclease, permitindo que ocorra a recombinação desejada (Datsenko & Wanner, 2000). Logo, este método oferece uma alternativa para a recombinação homóloga em bactéria, contanto que esta seja modificada recebendo um plasmídeo que contenha os genes α , β e exo . Para que a recombinação homóloga mediada pelo sistema λ -Red possa ser utilizada para modificação de genes em bactérias, é necessário que sejam construídos cassetes de recombinação com sequências franqueadoras homólogas às sequências flanqueadoras do gene que se deseja editar, ou ainda, homólogas às extremidades do próprio gene. Este método não requer sequências flanqueadoras longas, sendo necessárias no mínimo 40 nucleotídeos, e também não exige enzimas de restrição (Datsenko & Wanner, 2000).

Whitten *et al.* (2016) demonstrou que o uso desta tecnologia é bastante eficiente para o *knockout* deste mesmo gene de interesse *rnc* (codifica RNaseIII) na linhagem de bactéria simbiote BFo2, utilizada como hospedeiro para entrega de dsRNA ao inseto *Frankliniella occidentalis*. Em parceria com o prof. Paul Dyson, foi empregada esta técnica para nocautear o gene *rnc* de *P. agglomerans* 33.1, impedindo a produção de RNaseIII, para expressar dsRNA contra genes-alvo do inseto *D. saccharalis*.

A primeira etapa consistiu na construção do cassete molde para recombinação. Foi determinado que o mesmo consistiria na sequência do próprio gene *rnc* de *P. agglomerans* 33.1 interrompida por uma sequência de antibiótico, canamicina (*kan*). Para isto, foi realizada a amplificação do gene *kanR* empregando-se *primers* contendo sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *Bss*HIII e *Srf*I (Figura 8), que em seguida foi clonado em vetor pGEM-T *Easy*.

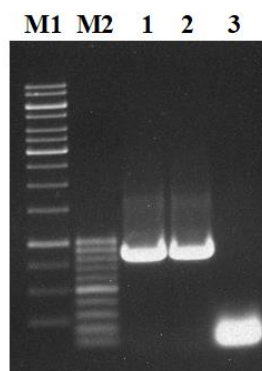


Figura 8. Produto da amplificação do gene *kanR* clonado em plasmídeo pGEM-T *Easy*. Nas primeiras canaletas estão representados os marcadores moleculares de 1 Kb (M1) e 100 pb (M2) (Fermentas) respectivamente, seguido de das amostras do gene em questão (1 e 2; tamanho esperado do amplicon: 832 pb) e do controle negativo da reação (3).

Esta construção pGEM-T::*kanR* foi então digerida com as enzimas *Bss*HII e *Srf*I, liberando o inserto (Figuras 9 e 10A). A construção pGEM-T::*rnc*, que já se encontrava previamente construída (item 3.2.3), também foi digerida com as mesmas enzimas (Figuras 9 e 10B). Sabendo que o gene que codifica a RNaseIII possui naturalmente sítios de reconhecimento para a enzima *Bss*HII na posição/nt 274 e para enzima *Srf*I na posição/nt 507, esta segunda digestão ocasionou o rompimento do gene *rnc*, gerando extremidades coesivas e complementares àquelas presentes nas extremidades do inserto *kanR* recuperado. Essa complementariedade facilitou a ligação, posteriormente, do inserto ao vetor recuperado, e assim, foi criado o molde para recombinação, o qual, por sua vez, é constituído pelo gene do antibiótico de seleção *kanR* com regiões flanqueadoras homólogas ao gene *rnc* (*uspstream* e *downstream*) (Figura 10C).

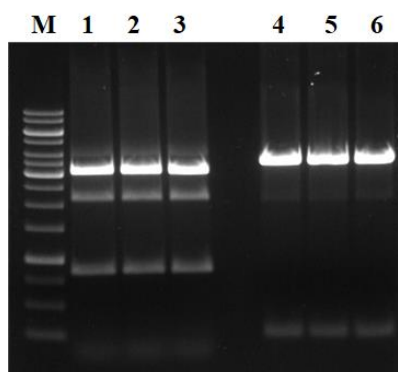


Figura 9. Digestão dos vetores pGEM-T::*kanR* e pGEM-T::*rnc* pelas enzimas *Bss*HII e *Srf*I. Na primeira canaleta, marcador molecular de 1 Kb (Fermentas). Nas canaletas 1, 2 e 3, amostras do vetor pGEM-T::*kanR* digeridas para recuperação do inserto, apresentando fragmento esperado de 842 pb (indicado pela seta). Já as canaletas 4, 5 e 6, contém amostras do vetor pGEM-T::*rnc* digeridas para recuperação do vetor (com gene *rnc* rompido), apresentando o fragmento esperado de 3463 pb (indicado pela seta).

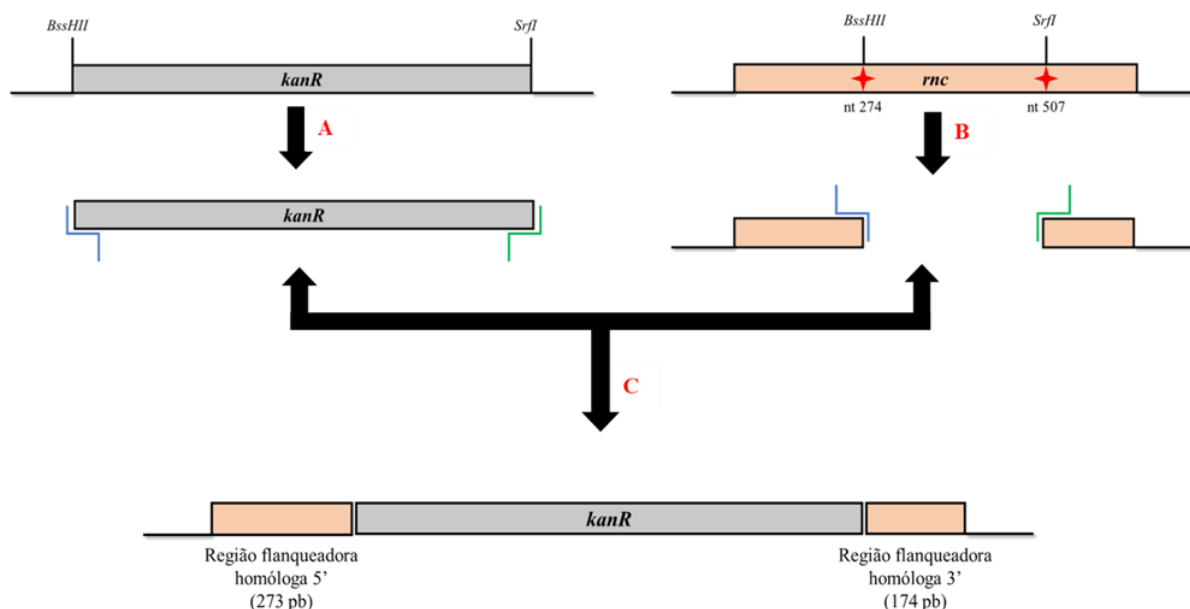


Figura 10. (A) Digestão do vetor pGEM-T::*kanR* com *BssHIII* e *SrfI*, liberando o fragmento de interesse *kanR*. Na figura, são indicados os sítios de reconhecimento das enzimas que foram adicionados, via PCR, exatamente nas extremidades da sequência gênica. A seta indica o inserto recuperado após a digestão. (B) Digestão do vetor pGEM-T::*rnc* com *BssHIII* e *SrfI*, a partir da qual foi recuperado o vetor contendo o gene *rnc* rompido após a digestão. Asteriscos vermelhos marcam as posições na sequência do gene *rnc* em que as enzimas realizaram o corte: bases 274 e 507. (C) A ligação do inserto recuperado em (A) com o vetor recuperado em (B) deu origem ao cassete molde para recombinação homóloga. Este molde é constituído pelo gene *kanR* flanqueado, *upstream* e *downstream* por regiões homólogas ao gene *rnc*, com tamanho de 273 pb e 174 pb, respectivamente.

A partir da obtenção do cassete molde, a recombinação do genoma da bactéria *P. agglomerans* 33.1, propriamente dita, foi realizada, gerando uma interrupção do gene *rnc* deste microrganismo pela inserção do gene de resistência ao antibiótico canamicina. Após a obtenção de colônias, foi realizada a confirmação por meio da amplificação do gene *rnc* tanto da linhagem selvagem como da editada, para comparação (Figura 11), e também por meio de sequenciamento (Figura 12). Nota-se que o gene original, da linhagem selvagem de *P. agglomerans* 33.1 possui um tamanho menor de 681 pb, em relação ao gene nocauteado, onde foi inserido a sequência de um outro gene de resistência a antibiótico, resultando num tamanho de 1.273 pb (Figura 12). À esta linhagem de endófito com o gene *rnc* editado passamos a nomear de *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc*.

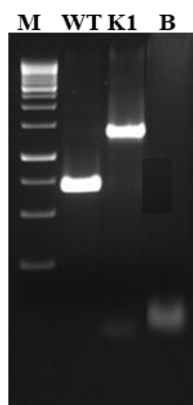


Figura 11. Amplificação do gene *rnc* de *Pantoea agglomerans* 33.1 selvagem (WT) (tamanho esperado: 681 pb) e da linhagem de *P. agglomerans* 33.1 nocauteada, com o gene *rnc* interrompido pela inserção do gene *kanR* (K1) (tamanho esperado: 1273 pb). B refere-se ao controle negativo da reação de amplificação e M representa o marcador molecular de 1 kb (Fermentas).

P.agg.33.1_rnc	ATGAACCCCATCCTTATTAATAAGCTTCAGCGCAAACGGGCTACACTTTTACTCATCCG	60
P.agg.33.1_K1_rnc	ATGAACCCCATCCTKATTAATAAGCTTCAGCGCAAACGGGSYACACTTTTACTCATCCG	60
P.agg.33.1_rnc	GAACTCTTGCACAGGCGCTAACGCACCGCAGCGCCAGCAGTAAGCACACGAGCGTCTC	120
P.agg.33.1_K1_rnc	GAACTCTTGCACAGGCGCTAACGCACCGCAGCGCCAGCAGTAAGCACACGAGCGTCTC	120
P.agg.33.1_rnc	GAATTTCTCGCGATTCCATTCTCAGCTATGTGATCGCCAATGCGCTTTATCATCGCTTT	180
P.agg.33.1_K1_rnc	GAATTTCTCGCGATTCCATTCTCAGCTATGTGATCGCCAATGCGCTTTATCATCGCTTT	180
P.agg.33.1_rnc	CCTCGCGTTGACGAGGGCGATATGAGCCGATGCGCGCAACCGTGGTGGTGGCAACAG	240
P.agg.33.1_K1_rnc	CCTCGCGTTGACGAGGGCGATATGAGCCGATGCGCGCATGAGCCATATCAACGGGAAA	240
P.agg.33.1_rnc	CTGGCGGAGAT---GGCGGAGAGTTGACCTTGGCGAATGTTGCG---CCTGGGGCC	293
P.agg.33.1_K1_rnc	CGTCTTCTCGAGGCGCGATTAATTCACACATGGATGCTGATTATATGGGTATAAAT	300
P.agg.33.1_rnc	GGGCGAACTGAAAAGCGGCGGATTTCTGTCGGA---ATCGATCCTGGCG-----G	340
P.agg.33.1_K1_rnc	GGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAACTATCGATTGATGGGAGCCCG	360
P.agg.33.1_rnc	ATACGGTGGAGC---GCTGATTTGGCGCATCTCTCGACAGCAATATCCAGACGGTGG	397
P.agg.33.1_K1_rnc	ATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGTAGCGTGGCAATGATGTTACAGATG	420
P.agg.33.1_rnc	AAAAGCTGATCCTTGACT-----	415
P.agg.33.1_K1_rnc	AGATGGTCACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTCCGACCATCAAGCATTTA	480
P.agg.33.1_rnc	-----	415
P.agg.33.1_K1_rnc	TCCGTACTCCTGATGATGCATGGTACTCACCCTGCGATCCCGGGAACAGCATCC	540
P.agg.33.1_rnc	-----	415
P.agg.33.1_K1_rnc	AGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTCC	600
P.agg.33.1_rnc	-----	415
P.agg.33.1_K1_rnc	TGCGCCGTTGCATTCGATTCTCTGTTGTAATGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTC	660
P.agg.33.1_rnc	-----	415
P.agg.33.1_K1_rnc	GTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTGTGATGCGAGTGATTTGATG	720
P.agg.33.1_rnc	-----	415
P.agg.33.1_K1_rnc	ACGAGCGTAATGGCTGGCCCTGTTGAACAAGTCTGAAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCAT	780
P.agg.33.1_rnc	-----	415
P.agg.33.1_K1_rnc	TCTCACCGGATTCAGTCTCACTCATGGTATTTCTCACTGATAACCTTATTTTGGAGC	840
P.agg.33.1_rnc	-----	415
P.agg.33.1_K1_rnc	AGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACAGTCGGAATCGCAGACCGATAACAG	900
P.agg.33.1_rnc	-----	415
P.agg.33.1_K1_rnc	ATCTTGCCATCCTATGAACTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCCTTACAGAAACGGCTTT	960
P.agg.33.1_rnc	-----GGTATCAGACGG	428
P.agg.33.1_K1_rnc	TTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATGACGTTTCATTGATGCTCG	1020
P.agg.33.1_rnc	CCTCGAGCAGATTAGCCCGGGCGATAAACAAGATCCGAAAACCCGCTGCGAGGATA	488
P.agg.33.1_K1_rnc	ATGAGTTTTTCTAAGCCCGGGCGATAAACAAGATCCGAAAACCCGCTGCGAGGATA	1080
P.agg.33.1_rnc	TCTGCAGGGGCGTCACTGCCGCTGCCGCTCTATCTGGTGGTGCAGGTGCGTGGCGAAGC	548
P.agg.33.1_K1_rnc	TCTGCAGGGGCGTCACTGCCGCTGCCGCTCTATCTGGTGGTGCAGGTGCGTGGCGAAGC	1140
P.agg.33.1_rnc	CCACGATCAGGAATTCACCATTCACCTGT-CAGGTGAGTGGCATGGCTGAACCGGTGGTGG	607
P.agg.33.1_K1_rnc	CCACGATCAGGAATTCACCATTCACCTGTTCAGGTGAGTGGCATGGCTGAACCGGTGGTGG	1200
P.agg.33.1_rnc	GCGTAGGCTCCAGCCCGCTAAAGCAGAACAGGCAGCTGCCGAACAGGCGCTAATTAAC	667
P.agg.33.1_K1_rnc	GCGTAGGCTCCAGCCCGCTAAAGCAGAACAGGCAGCKSCMGMRCAGGCGCTAATTAAC	1260
P.agg.33.1_rnc	TAGGTCTCGAATAG 681	
P.agg.33.1_K1_rnc	TAGGTYTCGAATAG 1274	

Figura 12. Alinhamento entre as sequências do gene *rnc* de *Pantoea agglomerans* 33.1 selvagem (P.agg.33.1_rnc) e de *P. agglomerans* 33.1 nocauteada (P.agg.33.1_K1_rnc). Em verde, destacam-se os braços homólogos entre o gene original e o editado. Em cinza, destaca-se a sequência do gene de resistência ao antibiótico canamicina (*kanR*), presente somente no gene nocauteado.

5.3.4. Curva de crescimento de *P. agglomerans* 33.1 nocauteada

Após a confirmação do nocaute do gene *rnc* por meio da sua interrupção pelo gene de resistência ao antibiótico canamicina (*kanR*), a linhagem com o gene nocauteado P.agg.33.1 Δ *rnc* foi avaliada quanto à cinética de crescimento em relação à linhagem selvagem (P.gg.33.1 WT) no meio de cultura LB líquido com e sem a adição de canamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), sendo observado algumas diferenças nas fases de crescimento em comparação com a linhagem selvagem (Figura 13).

Quando comparadas em relação ao crescimento em meio de cultura LB não seletivo (sem a adição de canamicina), as linhagens P.gg.33.1 Δ *rnc* e WT apresentam uma diferença muito reduzida no padrão de crescimento (Figura 13). A linhagem nocauteada apresentou um crescimento levemente inferior em relação à linhagem selvagem na etapa inicial do crescimento bacteriano, que compreende o início da fase *lag*. No entanto, é possível observar uma menor diferença entre o crescimento das linhagens logo em 8 horas após a incubação, principalmente em meio de cultura sem adição de antibiótico. Portanto, ambas as linhagens se desenvolvem praticamente da mesma forma.

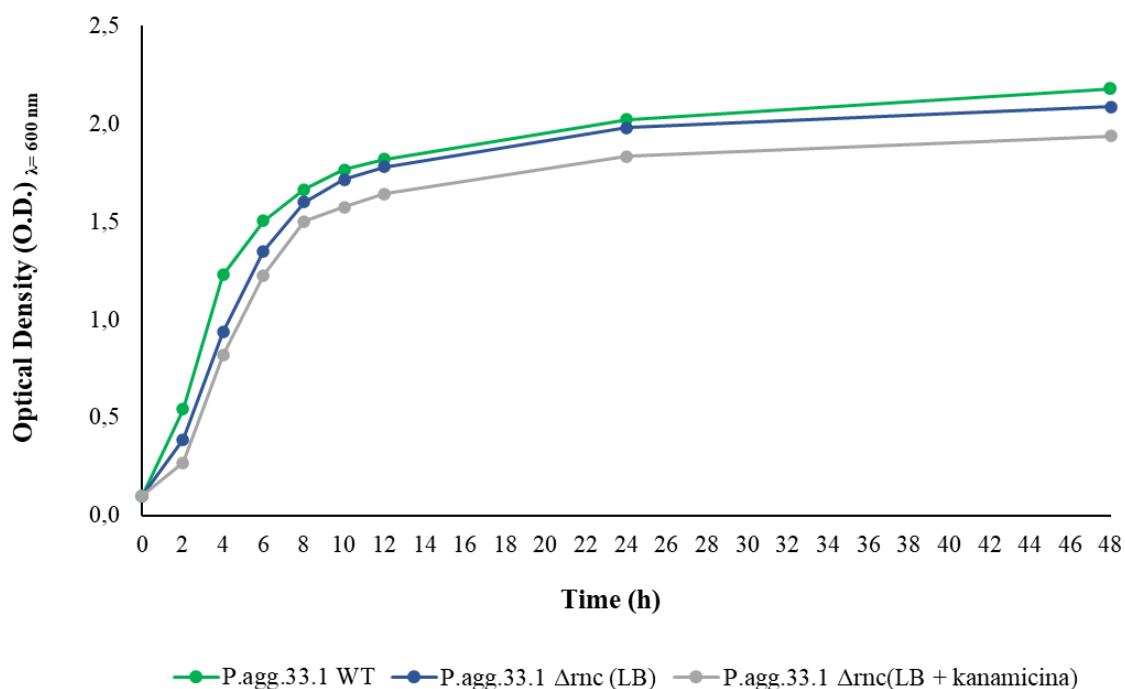


Figura 13. Curva de crescimento das linhagens *Pantoea agglomerans* 33.1 selvagem (P.agg.33.1 WT) e *P. agglomerans* 33.1 com o gene *rnc* nocauteado (P.agg.33.1 Δ *rnc*) em meio LB não seletivo (LB) e meio de cultura LB acrescido de canamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) (LB + Canamicina).

O tempo total decorrido para alcance da fase estacionária do crescimento pelas linhagens foi de aproximadamente 12 h. Após esse tempo, a densidade óptica aferida passou a apresentar valores constantes até o período final das leituras em 48 h de crescimento. A linhagem *P.agg.33.1Δrnc* em meio com e sem antibiótico em relação à linhagem selvagem apresentou alta correlação em relação à curva de crescimento bacteriano, $R^2= 0,985$ e $R^2= 0,992$ respectivamente (Figura 14). Portanto, o nocaute do gene *rnc* parece não afetar a viabilidade deste microrganismo, já que a mesma manteve a mesma capacidade de crescimento.

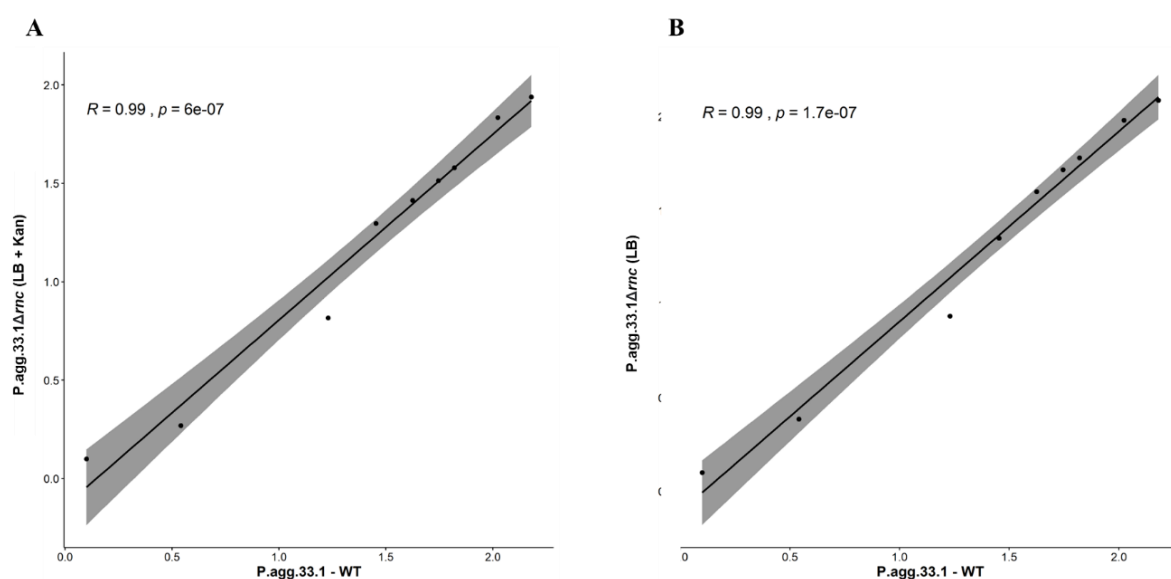


Figura 14. Correlação do crescimento das linhagens *Pantoea agglomerans* 33.1Δ*rnc* (*P.agg.33.1Δrnc*) e *Pantoea agglomerans* 33.1 WT (*P.agg.33.1 WT*). (A) Correlação do crescimento entre as linhagens em meio de cultura LB não seletivo. (B) Correlação do crescimento da linhagem *P.agg.33.1Δrnc* em meio de cultura LB seletivo, acrescido de canamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) com a linhagem *P.agg.33.1Δrnc* crescida em meio de cultura LB não seletivo. As linhagens apresentam uma forte correlação positiva no crescimento em ambos os meios.

5.3.5. Detecção da colonização endofítica de *P. agglomerans* 33.1Δ*rnc* em plântulas de cana-de-açúcar por microscopia Confocal

Considerando a utilização de *P. agglomerans* 33.1 na colonização dos tecidos de cana-de-açúcar e, simultaneamente, expressão de dsRNA contra genes-alvo da broca da cana-de-açúcar é fundamental que a *P. agglomerans* 33.1 com o gene *rnc* nocauteado mantenha sua capacidade de colonizar os tecidos da planta. Portanto, para averiguar se o nocaute gênico afetou sua capacidade endofítica, *P. agglomerans* 33.1 com o gene *rnc* nocauteado foi transformada com o plasmídeo pCM88 para expressão de *GFP* e posterior ensaio de colonização em plântulas de cana-de-açúcar. As bactérias expressando *GFP* foram obtidas (Figura 15).

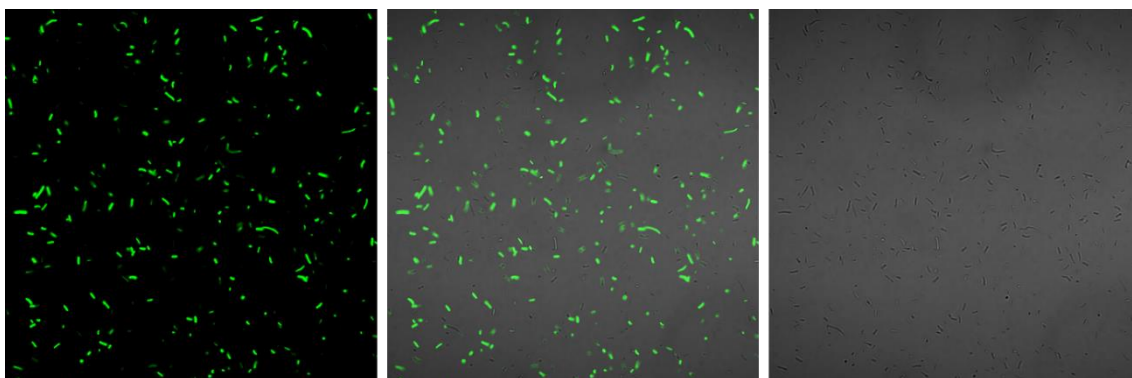


Figura 15. Visualização em microscópio confocal de *Pantoea agglomerans* 33.1 com o gene *rnc* editado (P.agg.33.1-K1) expressando GFP após transformação com o plasmídeo pCM88.

A colonização de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar foi observada por microscopia confocal com *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* expressando *GFP*. Foi possível observar 6 dias após a inoculação (DAI), a presença de *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* em tecidos de raiz. Estudos anteriores já haviam demonstrado a capacidade de *P. agglomerans* 33.1 transformada com pNKGFP para emissão de fluorescência, se agregar na superfície das raízes de cana-de-açúcar, formando um biofilme aos 5 dias após a inoculação (Quecine *et al.*, 2012). No entanto, não tinham sido observadas células bacterianas fluorescentes no interior dos tecidos da cana-de-açúcar, assim como fomos capazes de mostrar neste trabalho. Demonstramos que o *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* também foi capaz de colonizar, além dos tecidos radiculares, a parte aérea das plântulas de cana-de-açúcar, especificamente em células de vasos condutores (xilema), logo após seis dias da inoculação (Figura 16). Com estes resultados, pudemos concluir que a interrupção do gene *rnc*, feita com o propósito de evitar a produção da enzima RNaseIII, não afetou a bactéria endofítica *P. agglomerans* 33.1 no quesito capacidade de colonização do hospedeiro vegetal.

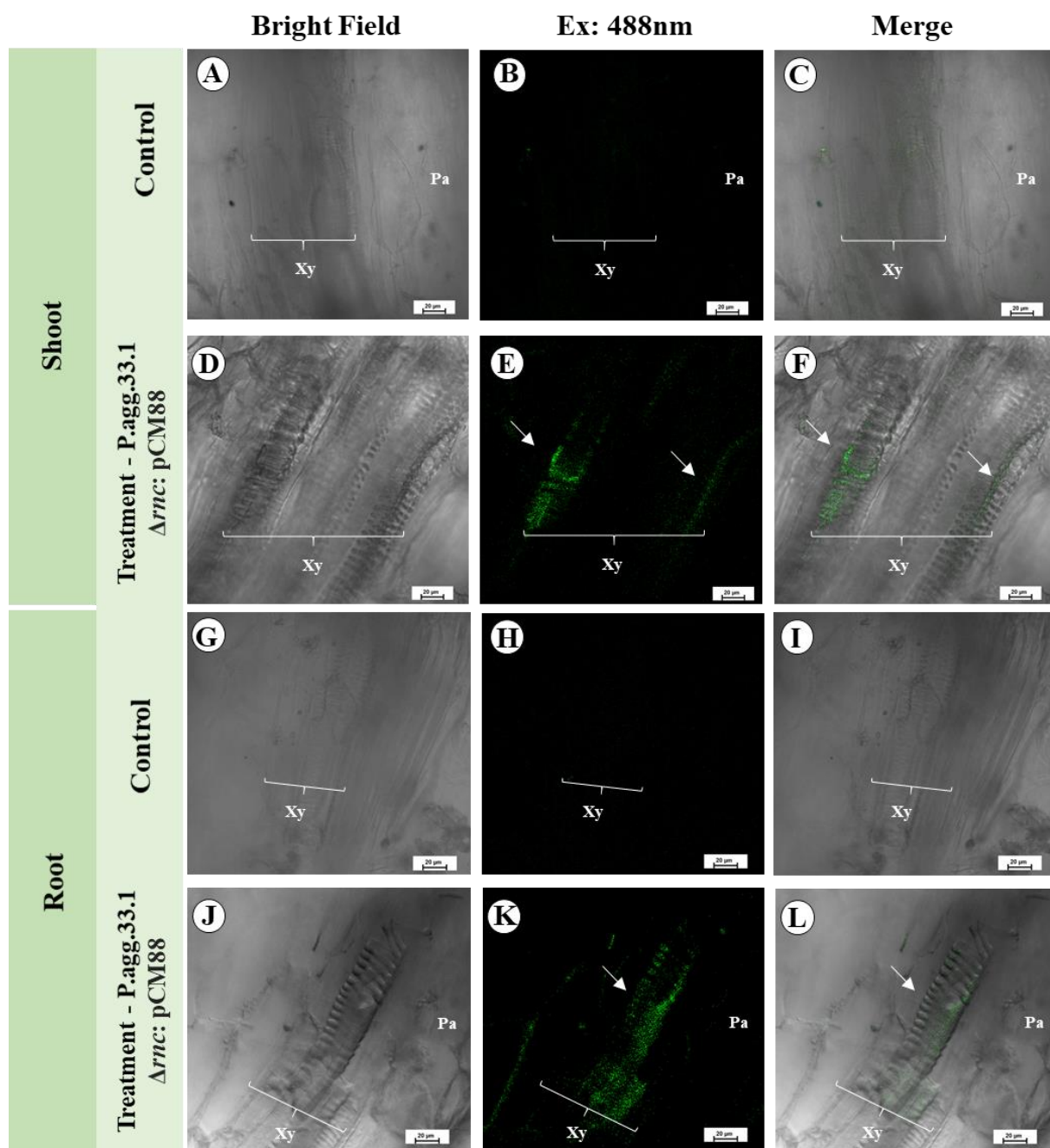


Figura 16. Seções longitudinais de plântulas de cana-de-açúcar não inoculadas (A-C; G-I) e inoculadas (D-F; J-L), 6DAI, com microrganismo endofítico *Pantoea agglomerans* 33.1 com gene *rnc* nocauteado e expressando GFP (*P.agg.33.1* $\Delta rnc: pCM88$). A-C. Parte aérea (caule) de plântulas de cana-de-açúcar sem a presença do microrganismos no xilema. D-F. Parte aérea (caule) de plântulas de cana-de-açúcar inoculadas indicando a presença de bactérias endofíticas *P. agglomerans* 33.1 com o gene *rnc* nocauteado e expressando GFP (*Treatment - P.agg.33.1* $\Delta rnc: pCM88$) no interior dos elementos dos vasos do xilema (setas). Na raiz (G-L), a planta controle não apresentou bactérias nos xilemas (G-I). Nas raízes das plântulas de cana-de-açúcar infectadas, observou-se *P. agglomerans* 33.1 com *rnc* nocauteado nos elementos dos vasos (setas em K-L). Observe que, tanto na parte aérea quanto na raiz, a bactéria parece estar associada às paredes dos vasos. Xy, xilema; Pa, parênquima.

5.3.6. Isolamento de *P. agglomerans* 33.1 Δrnc a partir de plântulas de cana-de-açúcar inoculadas

Por meio da contagem das colônias crescidas nas placas obtidas com o reisolamento *P. agglomerans* 33.1 Δrnc a partir de plântulas inoculadas (Figuras 17 e 18), foi possível demonstrar a linhagem quando adicionada ao meio de cultivo *in vitro*, foi capaz de colonizar eficientemente as plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas.

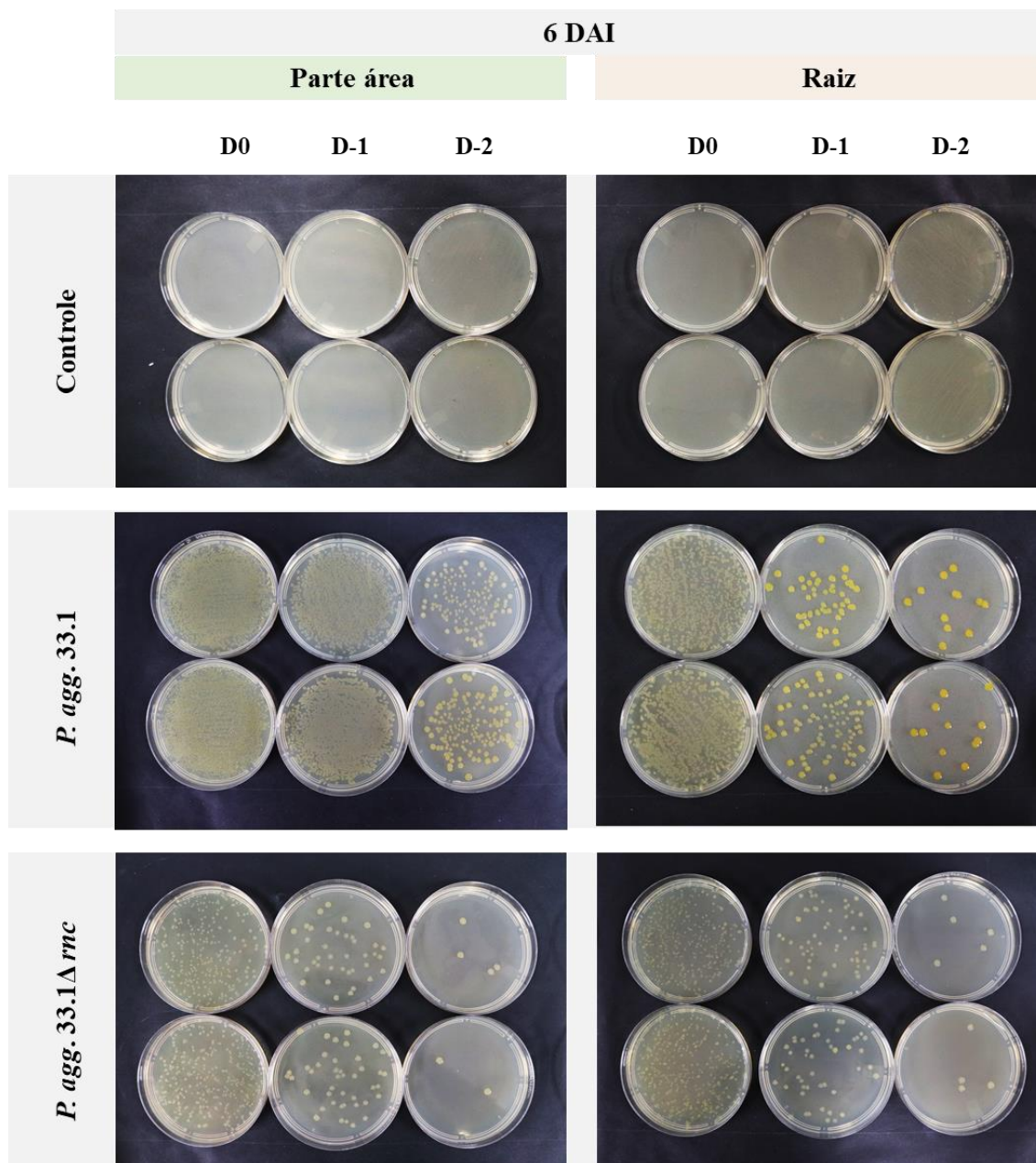


Figura 17. Placas de petri contendo meio LB indicando o crescimento de colônias de *Pantoea agglomerans* 33.1 selvagem (WT) e *Pantoea agglomerans* 33.1 Δrnc isoladas de tecidos de raiz e parte aérea de plântulas de cana-de-açúcar após 6 dias da inoculação (DAI). D0, D-1 e D-2 correspondem às diluições utilizadas no experimento de 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} , respectivamente.

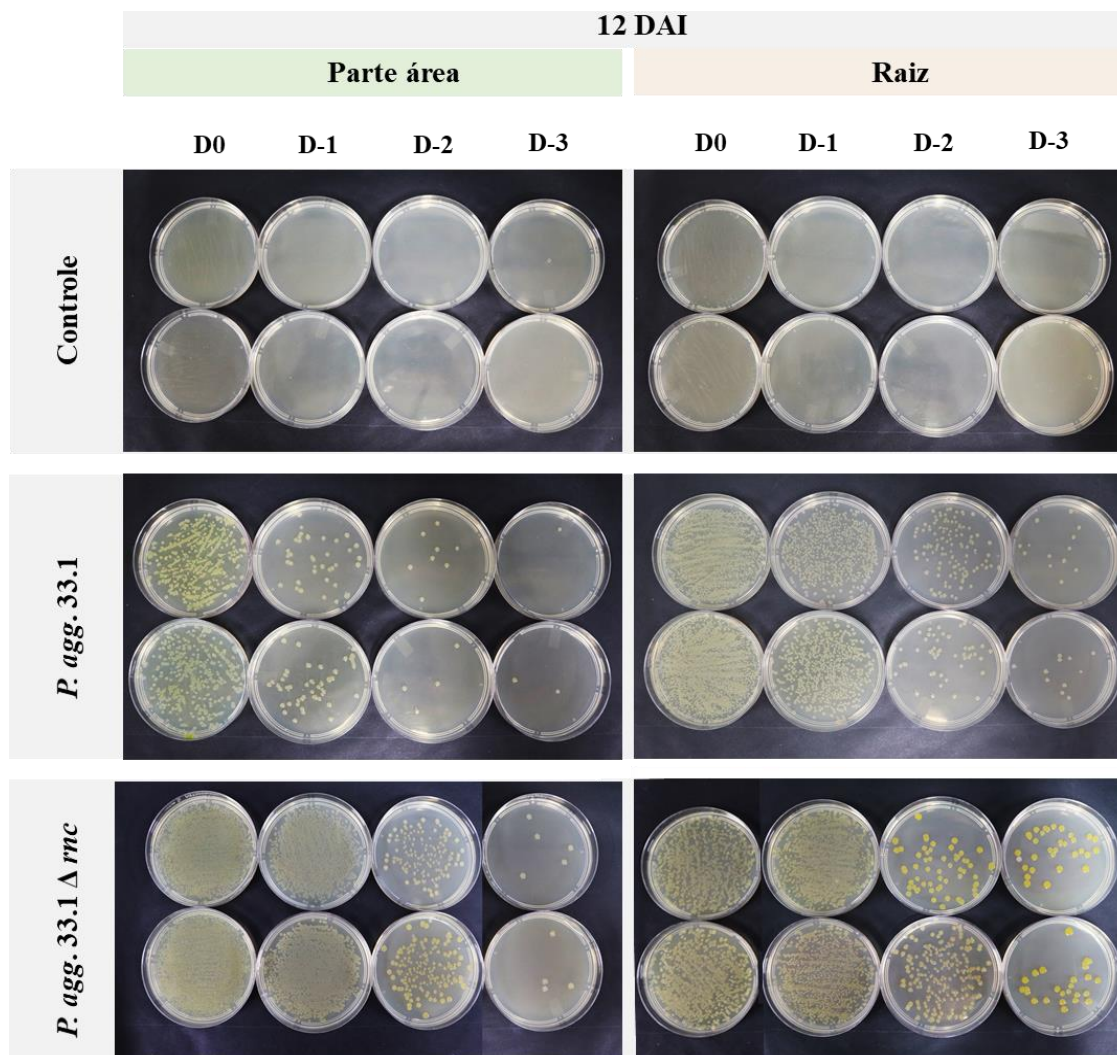


Figura 18. Placas de petri contendo meio LB (Luria-Bertani) indicando o crescimento de colônias de *Pantoea agglomerans* 33.1 selvagem (WT) e *Pantoea agglomerans* 33.1 Δrnc isoladas de tecidos de raiz e parte aérea de plântulas de cana-de-açúcar após 12 dias da inoculação (DAI). D0, D-1, D-2 e D-3 correspondem às diluições utilizadas no experimento de 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , respectivamente.

Após 6 DAI (primeira amostragem) das plântulas, *P. agglomerans* 33.1 Δrnc foi observada em maior densidade nas raízes de cana-de-açúcar, do que na parte aérea, sendo que o mesmo comportamento foi observado para a linhagem selvagem da bactéria (*P.agg.33.1* WT) (Tabela 4). Apesar de a linhagem selvagem ter apresentado uma densidade de colonização maior nos tecidos da planta, a nocauteada também se mostrou ser capaz de colonizar seu hospedeiro vegetal, mantendo sua capacidade como microrganismo endofítico. Bactérias endofíticas, no geral, são encontradas em maiores concentrações nas raízes, ocorrendo uma gradiente decrescente dessa densidade dos ramos para folhas (Lamb *et al.*, 1996). A primeira etapa de colonização consiste justamente em colonizar a superfície das raízes, para então, conseguirem entrar em seus hospedeiros (Gyaneshwar *et al.*, 2001; James *et al.*, 2002; Roncato-Maccari *et al.*, 2003).

Tabela 11. Densidade bacteriana de *Pantoea agglomerans* selvagem (P.agg.33.1 WT) e *Pantoea agglomerans* com o gene *rnc* nocauteado (P.agg.33.1 Δ *rnc*), associada a plantas de cana-de-açúcar 6 dias após inoculação.

Ponto de amostragem na planta	6 DAI		
	Densidade bacteriana (UFC grama de amostra ⁻¹) a		
	Controle	P.agg.33.1 WT	P.agg.33.1 Δ <i>rnc</i>
Raiz	0 c	6,85x10 ⁴ a	4,67x10 ⁴ b
Parte aérea	0 b	1,08x10 ⁴ a	0,98x10 ⁴ a

a: A densidade bacteriana foi mensurada após 6 dias de inoculação das linhagens P.agg.33.1 WT e P.agg.33.1 Δ *rnc* em meio de cultivo contendo plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. O tratamento controle consistia na adição de meio LB sem crescimento bacteriano. Os dados apresentados são a média de três repetições. Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente ($p>0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Para 12 DAI (segunda amostragem), houve um aumento de 3,48 vezes e 2,65 vezes na densidade de bactérias P.agg.33.1 WT e P.agg.33.1 Δ *rnc*, respectivamente, nas raízes. Já na parte aérea, tecido no qual novamente a densidade bacteriana em ambos os tratamentos foi menor, o aumento da densidade do 6 DAI para o 12 DAI foi de 1,23 vezes no caso da linhagem P.agg.33.1 WT e 1,22 vezes no caso de P.agg.33.1 Δ *rnc* (Tabela 5).

É possível ainda notar que, apesar de a colonização inicial pelas raízes ser maior na linhagem P.agg.33.1 WT do que na linhagem nocauteada, P.agg.33.1 Δ *rnc*, esta diferença acaba sendo superada e a colonização da parte aérea, ao final, acaba sendo igual para ambas. Isto evidencia que mesmo após a edição do gene *rnc*, a bactéria *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* foi capaz de colonizar eficientemente as plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas (Figura 19).

Tabela 5. Densidade bacteriana de *Pantoea agglomerans* selvagem (P.agg.33.1 WT) e *Pantoea agglomerans* com o gene *rnc* nocauteado (P.agg. Δ *rnc*), associada a plantas de cana-de-açúcar 12 dias após inoculação.

Ponto de amostragem na planta	12 DAI		
	Densidade bacteriana (UFC grama de amostra ⁻¹) a		
	Controle	P.agg.33.1 WT	P.agg.33.1 Δ <i>rnc</i>
Raiz	0 c	2,39x10 ⁵ a	1,24x10 ⁵ b
Parte aérea	0 b	1,34x10 ⁴ a	1,20x10 ⁴ a

a: A densidade bacteriana foi mensurada após 12 dias de inoculação das linhagens P.agg.33.1 WT e P.agg.33.1 Δ *rnc* em meio de cultivo contendo plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. O tratamento controle consistia na adição de meio LB sem crescimento bacteriano. Os dados apresentados são a média de três repetições. Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente ($p>0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

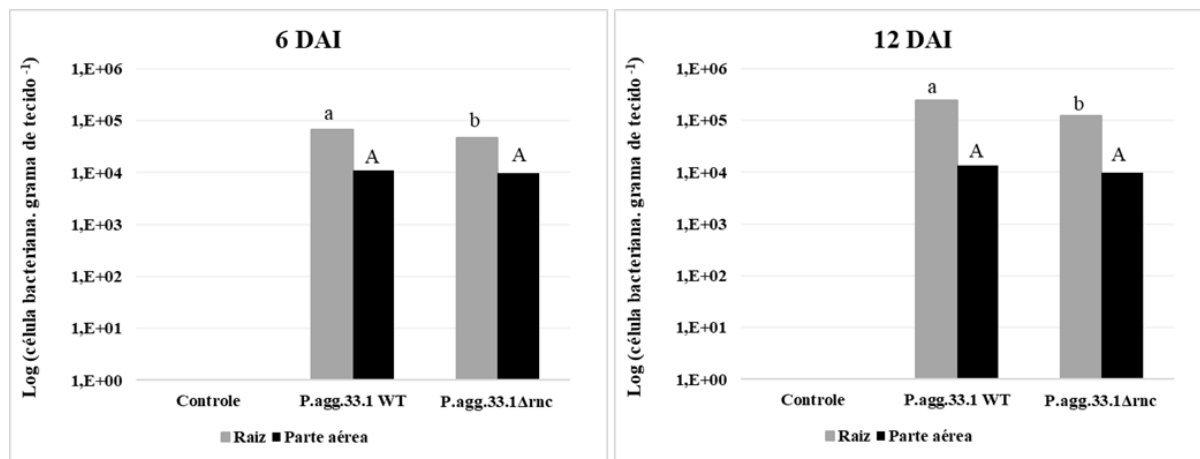


Figura 19. Densidade de *Pantoea agglomerans* 33.1 WT e *Pantoea agglomerans* 33.1 Δrnc mensurada por reisolamento em associação com plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas. As amostras foram coletadas após 6 (A) e 15 dias (B) da inoculação bacteriana. Tratamentos com letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) de acordo com o teste de Tukey quanto à densidade bacteriana em tecidos de raiz. Tratamentos com letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) de acordo com o teste de Tukey quanto à densidade bacteriana em tecidos de parte aérea.

5.3.7. Promoção do crescimento vegetal de *P. agglomerans* 33.1 Δrnc em plântulas de cana-de-açúcar

Para garantir que o nocaute do gene *rnc* de *P. agglomerans* 33.1 não afetou negativamente sua capacidade de promoção de crescimento vegetal, realizamos um ensaio de colonização de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar com a bactéria editada e avaliamos o peso de matéria seca da parte aérea e das raízes destas plântulas 45 dias após a inoculação (Figura 20). Desse modo, demonstramos que as plantas inoculadas com a linhagem selvagem de *P. agglomerans* 33.1 e as plantas inoculadas com *P. agglomerans* 33.1 Δrnc apresentaram biomassa seca de ambos os tecidos superior ao tratamento controle, isto é, às plantas de cana-de-açúcar sem adição de bactéria. Essa diferença no crescimento das plantas colonizadas pelas bactérias foi possível de ser notada até mesmo visualmente.

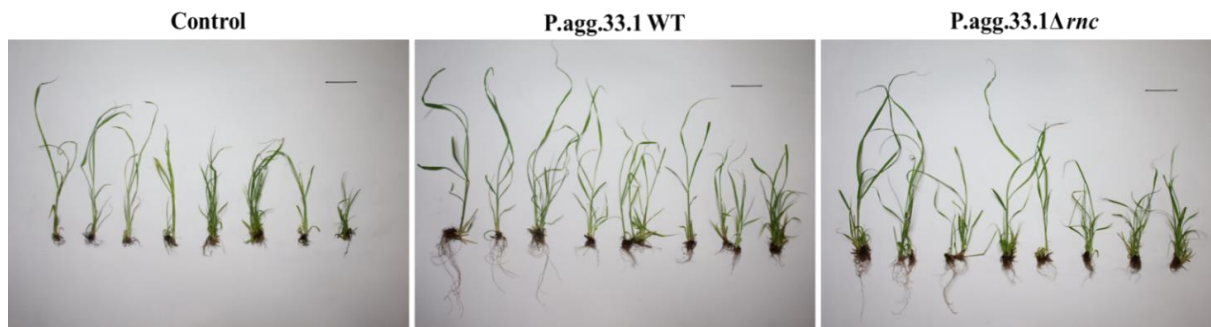


Figura 20. Plântulas de cana-de-açúcar após 45 dias da inoculação com bactérias endofíticas *Pantoea agglomerans* 33.1, para avaliação de crescimento vegetal promovido pelo microrganismo em questão. A primeira foto à esquerda corresponde às plântulas controle, ou seja, sem adição de bactéria. A foto central diz respeito às plântulas inoculadas com a linhagem selvagem e *P. agglomerans* 33.1 (P.agg.33.1WT). A foto à direita corresponde às plântulas inoculadas com *P. agglomerans* 33.1 com o gene *rnc* nocauteado (P.agg.33.1 Δ rnc). Observa-se que as plantas correspondentes aos tratamentos com bactéria (P.agg.33.1WT e P.agg.33.1 Δ rnc) apresentaram maior desenvolvimento de parte aérea e raiz, em comparação com as plantas controle.

No caso da raiz, as plantas inoculadas com *P. agglomerans* 33.1 WT tiveram um acréscimo de 1,7 vezes em sua biomassa. Similarmente, plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *P. agglomerans* 33.1 Δ rnc, acumularam biomassa de raiz 1,73 vezes mais quando comparado às plantas controle. Já em relação a parte aérea, o aumento da biomassa seca de plantas inoculadas com *P. agglomerans* 33.1 WT e *P. agglomerans* 33.1 Δ rnc, em relação ao controle, foi de 1,47 e 1,58 vezes, respectivamente (Figura 21). Isso comprova que a capacidade de promover o crescimento vegetal se manteve no endofítico mesmo após o nocaute de *rnc*.

Estudos anteriores demonstraram a capacidade de promoção de crescimento de *P. agglomerans* 33.1 em outras cultivares de cana-de-açúcar. A inoculação do substrato de plantas de cana-de-açúcar SP80-1842 com *P. agglomerans* 33.1 promoveu o acúmulo de biomassa dos tecidos da parte aérea significativamente maior que no controle não inoculado. Já na cultivar SP80-3240, o aumento do acúmulo de biomassa também foi observado, só que em tecidos radiculares (Quecine *et al.*, 2012). Neste caso, para a cultivar IACCTC05-8069, pudemos observar o aumento de biomassa tanto para tecidos de parte aérea quanto radiculares, mediante inoculação tanto com *P. agglomerans* 33.1 selvagem como com *P. agglomerans* 33.1 Δ rnc (Figura 21).

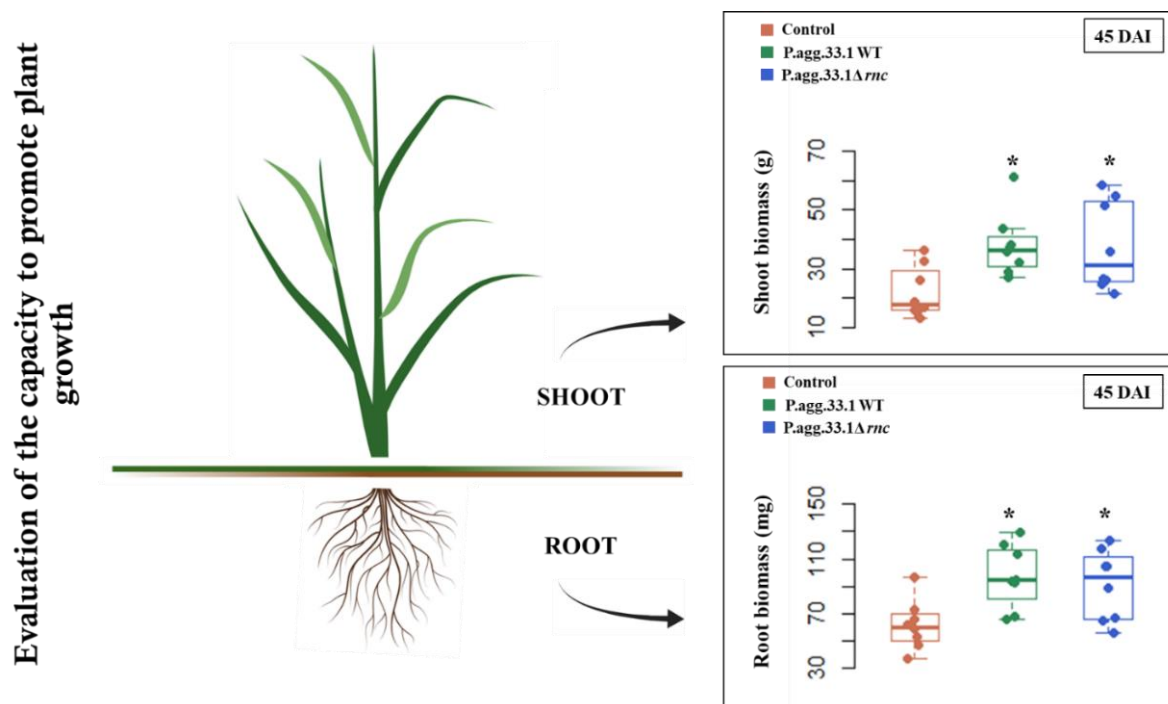


Figura 21. Promoção do crescimento vegetal de plântulas de cana-de-açúcar após 45 dias da inoculação com o endofítico *Pantoea agglomerans* 33.1. O gráfico superior mostra que a produção de biomassa relativa à parte aérea de plantas inoculadas tanto com *P. agglomerans* 33.1 selvagem (P.agg.33.1WT) como com *P. agglomerans* 33.1 com o gene *rnc* nocauteado (P.agg.33.1Δ*rnc*) ($p=0,01037$) foi superior à biomassa produzida em plantas **controle**. No gráfico inferior, também pode ser observado um aumento na produção de biomassa de raiz em plantas inoculadas com P.agg.33.1WT e P.agg.33.1Δ*rnc* ($p=0,02044$).

Logo, corroboramos tanto a capacidade de colonização por *P. agglomerans* 33.1 de tecidos de cana-de-açúcar, como a capacidade de promover o crescimento vegetal se manteve no endofítico mesmo após o nocaute do gene *rnc*, que não prejudicou esta sua característica tão benéfica e desejada.

No que diz respeito às explicações de como estes microrganismos conseguem auxiliar no crescimento vegetal de seus hospedeiros, as mesmas podem ser classificadas em forma direta, por meio da disponibilização de nutrientes para a planta, fixação de nitrogênio atmosférico e produção de reguladores de crescimento vegetal (Shishido *et al.*, 1999); e forma indireta, por meio da redução de populações deletérias às plantas de interesse, atuando no controle biológico por competição por nutrientes, antibiose e indução de resistência sistêmica no hospedeiro (Ramamoorthy *et al.*, 2001; Sturz *et al.*, 2000). De maneira geral, a bactéria *P. agglomerans* tem seu potencial endofítico demonstrado para aplicação na agricultura. Existem diversos estudos demonstrando seu potencial na indução de resistência contra diversos patógenos (Jeun *et al.*, 2004; Ongena *et al.*, 2000), além do uso direto da mesma no controle de diversas pragas e microrganismos antagonistas (Bardin *et al.*, 2003; Bonaterra *et al.*, 2003,

Gunasinghe *et al.*, 2004). Este gênero bacteriano também é conhecido como um importante fixador de nitrogênio não simbiótico (Asis & Adach, 2003; Loiret *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2001), além de promover a solubilização de fósforo (Malboobi *et al.*, 2009a; 2009b). Alguns estudos descrevem o gênero *Pantoea* como produtor de fitormônios como o ácido-indol-acético (Tsavkelova *et al.*; 2007; Zimmer *et al.*, 1994). No caso específico de de *P. agglomerans* 33.1, já foi demonstrado que o endofítico quando colonizando plantas de cana-de-açúcar é capaz de promover o crescimento vegetal através da indução da produção de quitinase e celulase nos tecidos radiculares, da solubilização de duas fontes diferentes de fosfato (fosfato de cálcio e fosfato de alumínio), da produção de ácido indolacético (IAA), e da fixação do nitrogênio (Quecine *et al.*, 2012).

5.3.8. Produção e acúmulo de dsRNA por *P. agglomerans* 33.1 Δrnc

Após validar o *knockout* do gene *rnc* na bactéria *P. agglomerans* 33.1 e verificar que esta interrupção gênica não afetou sua sobrevivência, crescimento, capacidade de colonizar os tecidos vegetais como microrganismos endofítico e capacidade de promover crescimento vegetal de seu hospedeiro, o próximo passo consistiu em transformar *P. agglomerans* 33.1 Δrnc para expressar e acumular dsRNA, uma vez que o nocaute seria responsável pela não produção da enzima de degradação de dsRNA, a RNaseIII.

Células competentes de *P. agglomerans* 33.1 Δrnc foram transformadas com o vetor pdag-*GFP*, que se caracteriza por possuir o gene *GFP* entre duas sequências convergentes de promotor *Ptac*. Desta forma, dá origem a moléculas de dsRNA do gene *GFP* (ds*GFP*). Logo, após a transformação da bactéria com este vetor, extraímos seu material genético e, após tratar com DNaseI e RNaseT1, aplicamos as amostras em gel de 2% agarose. Com a visualização do gel, foi possível observar a presença da banda que corresponde ao dsRNA (coluna 2, Figura 22), que é ausente na amostra proveniente da extração de *P. agglomerans* 33.1 WT transformada com pdag:*GFP* (coluna 1, Figura 22).

Portanto, conseguimos demonstrar que, uma vez que o *knockout* do gene *rnc*, responsável pela enzima RNaseIII, possibilitou o acúmulo de dsRNA produzido pelas bactérias *P. agglomerans* 33.1 Δrnc em seu interior, tornando esse sistema hábil e com grande potencial como mecanismo de entrega de dsRNA a insetos.

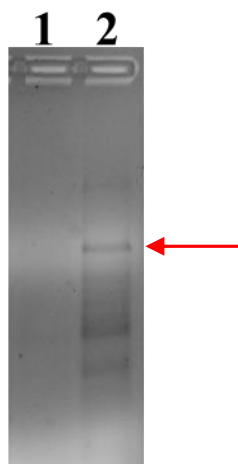


Figura 22. Produtos da extração de dsRNA de bactérias *Pantoea agglomerans* 33.1 em gel de agarose. 1 - bactéria *P. agglomerans* 33.1 WT transformada com *pdag-GFP*. 2 - bactéria *P. agglomerans* 33.1 Δrnc transformada com *pdag-GFP*.

5.3.9. Produção e acúmulo de dsRNA contra gene-alvo específico do inseto por *P. agglomerans* 33.1 Δrnc

Após confirmarmos o sucesso do nocaute gênico e a capacidade de acumular dsRNA por células da bactéria *P. agglomerans* 33.1 Δrnc , objetivamos fazer com que a mesma expressasse dsRNA contra um gene-alvo específico do inseto, neste caso, *Ds_up56* (gene codificador da enzima REase de *D. saccharalis*). Para este propósito, nosso colaborador neste trabalho, Prof. Paul Dyson, enviou o plasmídeo *pdag*, cuja alíquota foi utilizada para transformação em *E. coli* TOP10. Para confirmar a identidade do plasmídeo, realizamos uma minipreparação plasmidial dos clones que a princípio eram positivos, e através de uma digestão com *RsaI* confirmamos a identidade do plasmídeo. Os tamanhos esperados dos fragmentos após a restrição eram 22, 203, 676 e 1933 pb.

Uma vez confirmada a identidade do vetor, utilizando as mesmas amostras de minipreparação plasmidial e realizamos a digestão com *XbaI*, para linearizar o vetor e eliminar o gene que já estava inserido, o *dag*. Então, após a digestão, recortamos a banda do gel de agarose correspondente ao vetor, com tamanho esperado de 2.588 pb, e purificamos.

Também realizamos a digestão com *XbaI* do produto da amplificação do gene *Ds_up56*. Esta amplificação foi realizada com *primers* possuindo bordas para a enzima *XbaI*. Assim, após a digestão com a enzima, bordas coesivas complementares às bordas geradas no vetor de destino após digestão, foram geradas e facilitaram a ligação de ambos. Na figura 23 é possível observar a banda correspondente ao gene alvo, com tamanho esperado de 450 pb, a qual foi recortada do gel de agarose e purificada.

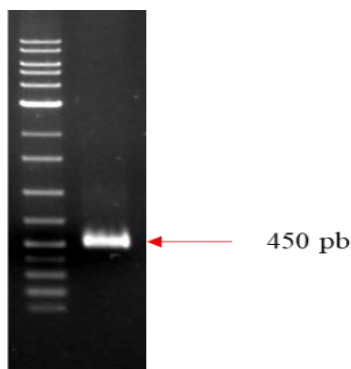


Figura 23. Marcador molecular 1 kb Plus (Sinapse). A próxima coluna representa à digestão do produto da amplificação do gene *Ds_up56*, com bordas compreendendo sítios de reconhecimento da enzima *XbaI*.

Finalmente, com o vetor e o inserto recuperados, realizamos a ligação deles, de modo a inserir o gene-alvo *Ds_up56* de *D. saccharalis* entre os promotores convergentes do vetor de silenciamento *pdag*. Após a reação de ligação, células competentes de *E. coli* TOP 10 foram transformadas com a construção *pdag:Ds_up56*. Seguimos com a minipreparação plasmidial e confirmação de colônias transformadas através de análise de restrição com enzimas *LguI* e *XhoI*. Em seguida, as minipreparações plasmidiais dos transformantes positivos de *E. coli* foram utilizados para transformação e obtenção de *P. agglomerans* 33.1 Δrnc contendo a construção *pdag:Ds_up56*.

A confirmação da transformação de *P. agglomerans* 33.1 Δrnc com *pdag:Ds_up56* se deu através de PCR de colônia utilizando *primers* específicos para o gene-alvo do inseto. Assim, foi possível obter uma única colônia positiva de *P. agglomerans* 33.1 Δrnc transformada com *pdag:Ds_up56*, como pode ser observado na Figura 24 (tamanho esperado do gene *Ds_up56*: 450 pb).

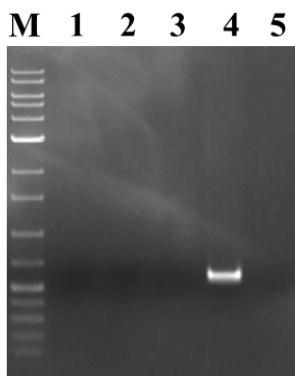


Figura 24. Marcador molecular 1 kb Plus (Sinapse). Colunas seguintes correspondem à produto de PCR de colônia realizada com *Pantoea agglomerans* 33.1 Δrnc após transformação com a construção *pdag:Ds_up56*. Colônia 4 corresponde a transformante positivo, com presença do fragmento gênico de interesse, *Ds_up56*, com tamanho esperado de aproximadamente 461 pb.

A partir da extração de dsRNA desta colônia positiva de *Pantoea agglomerans* 33.1 Δrnc , transformada com *pdag:Ds_up56*, foi possível observar a presença da banda que corresponde ao dsRNA (Figura 25), a qual não está presente em *P. agglomerans* 33.1 WT transformada com *pdag:Ds_up56*.

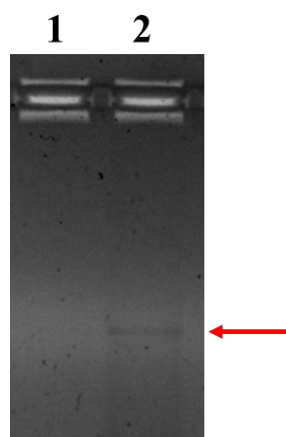


Figura 25. Produtos da extração de dsRNA de bactérias *Pantoea agglomerans* 33.1 em gel de agarose. 1 - bactéria *P. agglomerans* 33.1 WT transformada com *pdag:Ds_up56*. 2 - bactéria *P. agglomerans* 33.1 Δrnc transformada com *pdag:Ds_up56*.

Portanto, conseguimos demonstrar que o *knockout* do gene *rnc*, ou ainda, a inibição da enzima RNaseIII do microrganismo, possibilitou o acúmulo de moléculas de dsRNA produzido pelas bactérias *P. agglomerans* 33.1 Δrnc em seu interior. Isso comprova que este sistema de utilização de um microrganismo endofítico, com ausência de RNaseIII, é válido e apresenta grande potencial como vetor de entrega de dsRNA e controle de insetos-praga da agricultura, neste caso, *D. saccharalis*.

Este sistema parece ser promissor, uma vez que une as vantagens do uso de bactérias expressando dsRNA como método de entrega de dsRNA em sistemas de controle de insetos via RNAi, com outras vantagens que são fornecidas pelo endofítico ao seu hospedeiro vegetal. No que diz respeito à primeira abordagem, a interferência de RNA mediada por bactérias proporciona vantagens com economia de custos, viabilidade de produção em larga escala, e o fato de ser parcialmente resistente à degradação do dsRNA pelo hospedeiro antes de induzir efeito (Fraser *et al.*, 2000; Solis *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019; Huvenne & Smaghe, 2010; Goodfellow *et al.*, 2019). Já com relação à segunda, os benefícios promovidos pela característica endofítica de *P. agglomerans* 33.1 Δrnc , podem ser muitos, incluindo fixação de nitrogênio atmosférico, produção de reguladores de crescimento vegetal (IAA) e solubilização de fosfato (Asis & Adach, 2003; Loiret *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2001;

Malboobi *et al.*, 2009a; 2009b; Tsavkelova *et al.*; 2007; Zimmer *et al.*, 1994; Quecine *et al.*, 2012). Além disso, vale ressaltar que a bactéria *P. agglomerans* possui a capacidade de habitar diversas culturas agrícolas importantes, fenômeno este designado como colonização cruzada (Zakria *et al.* 2008; Quecine *et al.* 2012), possibilitando a extensão da utilização deste endofítico *P. agglomerans* 33.1 RNAi para o controle de insetos de outras culturas importantes para o agronegócio, além da cana-de-açúcar, como milho (Mcinroy & Kloepper, 1995), laranja (Araújo *et al.*, 2002), soja (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004), arroz (Verma *et al.*, 2004), algodão (Mcinroy & Kloepper, 1995), trigo (Ruppel *et al.*, 1992), café (Vega *et al.*, 2005), e feijão (Hsieh *et al.*, 2005), que já foram descritas como hospedeiros deste endofítico.

No entanto, como acontece com qualquer nova tecnologia emergente, os compostos de biocontrole desenvolvidos à base de RNA terão que ser aprovados pelas estruturas regulatórias existentes (Taning *et al.*, 2020). Estudos de biossegurança, antes da aprovação desses produtos, especialmente adaptados para confirmar a seletividade prevista do dsRNA, podem ser conduzidos de forma confiável de acordo com as abordagens de avaliação de risco existentes, levando em consideração o novo modo de ação desses produtos (Arpaia *et al.*, 2017). O silenciamento de genes induzido por aplicação (SIGS) e outras aplicações exógenas como imersão de raízes ou sementes, injeção de tronco, absorção por pecíolos e inoculação mecânica (Morinaka *et al.*, 2006; Zotti *et al.*, 2018), como alternativas à abordagem de plantas GM, silenciam genes alvo em um organismo alvo sem introduzir alterações hereditárias no genoma, portanto, não se enquadram nas restrições atualmente definidas pelo regulamento da UE sobre organismos geneticamente modificados (OGM) (Taning *et al.*, 2020). Todavia, obviamente, isso exclui o cenário em que o produto final contendo o ingrediente ativo do dsRNA é um OGM, como é o caso quando os microrganismos são projetados para produzir dsRNAs específicos, como a estratégia apresentada neste capítulo baseada no uso do endofítico *P. agglomerans* 33.1 Δrnc expressando dsRNA contra o gene-alvo do inseto-praga. Para estes casos, será necessário primeiro vislumbrar um caminho plausível através do qual organismos não-alvo (NTOs – *non-target organisms*) possam ser expostos ao composto e não apresentar danos (Taning *et al.*, 2020). Nesse contexto, os NTOs deverão primeiro ser expostos à molécula ativa de dsRNA, em quantidades suficientemente altas para serem absorvidas pelo NTO e em quantidades suficientes para ativar a maquinaria de RNAi endógena do NTO. Uma vez que a maquinaria de RNAi do NTO é ativada, deverá levar à supressão ou degradação do mRNA correspondente de maneira dependente da sequência. A perda do transcrito alvo deverá eventualmente ter um efeito adverso no NTO. Se a probabilidade de qualquer uma das etapas no caminho para o dano for provada

experimentalmente ser impossível ou improvável, então o risco do composto de biocontrole baseado em RNAi para o NTO pode ser considerado insignificante (Taning *et al.*, 2020).

Além disso, alguns efeitos independentes de sequência no NTO após a exposição ao dsRNA também podem afetar potencialmente o NTO, incluindo estimulação imunológica ou saturação das enzimas envolvidas na maquinaria de RNAi, que por sua vez poderia afetar negativamente a aptidão do NTO (Taning *et al.*, 2020). A probabilidade de isso ocorrer, no entanto, provavelmente será baixa, considerando as múltiplas barreiras que existem neste caminho para o dano ocorrer no NTO (Lundgren & Duan, 2013). Além disso, no que diz respeito aos microrganismos modificados para expressar dsRNA, elementos de expressão baseados em plasmídeos podem ser transferidos entre espécies, resultando em problemas de contaminação biológica (Mendelsohn *et al.*, 2020).

Ainda assim, apesar da necessidade de desregulamentação de estratégias como a sugerida neste trabalho que envolve o emprego de microrganismos expressando dsRNA para controle de pragas agrícolas, o cenário é positivo, uma vez que discussões sobre a avaliação de risco dos mais diversos biopesticidas baseados em RNA estão em andamento no cenário atual. Em 2013, uma estrutura para a avaliação de risco de pesticidas baseados em RNA foi apresentada pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) em um relatório submetido ao Painel Consultivo Científico da Lei Federal de Inseticidas, Fungicidas e Rodenticidas (FIFRA) (EPA, 2013). A FIFRA respondeu a este documento organizando uma reunião no ano seguinte que abordou explicitamente várias preocupações relativas a considerações de risco ecológico e considerações de saúde humana, e forneceu várias recomendações para lidar com incertezas relacionadas a essas preocupações (FIFRA, 2014). Um exercício semelhante foi realizado pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) que desencadeou a coleta de revisões de literatura com base em informações científicas de estudos de RNAi (Paces *et al.*, 2017; Christiaens *et al.*, 2018; Dávalos *et al.*, 2019). Essas revisões, destinadas a apoiar a avaliação de risco de plantas GM baseadas em RNAi, fornecem uma visão abrangente de RNAi e também serão úteis no desenvolvimento de diretrizes regulatórias para compostos de biocontrole baseados em RNA aplicados externamente. Com um objetivo semelhante, uma conferência da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) sobre pesticidas à base de RNA foi organizada em abril de 2019 em Paris, com o objetivo de fornecer uma visão geral da situação atual e possibilidades futuras para a regulamentação de compostos baseados em dsRNA aplicados externamente. Este evento forneceu contribuições e recomendações que apoiam o desenvolvimento de documento(s) de orientação pelo grupo de especialistas da OCDE sobre pesticidas baseados

em RNAi como ferramenta(s) prática(s) para formuladores de políticas e reguladores de pesticidas em todo o mundo (Taning *et al.*, 2020).

Outro aspecto que torna promissor o uso de compostos de biocontrole baseados em RNA, é que com essa abordagem, tempo e custo substanciais serão economizados no registro dessas novas biomoléculas. Isso leva em consideração o custo comparativamente baixo de aproximadamente US\$ 3 a 7 milhões para desenvolver um biopesticidas de RNAi e o curto período de cerca de 4 anos ou menos para entrar no mercado dos EUA, em contraste com mais de US\$ 280 milhões e quase 12 anos necessários para desenvolver um novo pesticida sintético (Marrone, 2014; Marrone, 2019).

Logo, frente ao contexto mundial de restrição de aumento de áreas agrícolas, mudanças climáticas, crescimento populacional, desafios quanto ao uso dos atuais pesticidas químicos e o ceticismo quanto à segurança das plantas GM, a aplicação exógena de dsRNA para proteção de cultivos é uma promessa atraente para atender a essas preocupações e necessidades da sociedade, embora seja necessário a criação e adoção, urgentemente, de diretrizes regulatórias mais apropriadas e padronizadas para facilitar todo o processo de comercialização desses compostos. No Brasil, por exemplo, medidas nesse sentido já estão sendo criadas, como o surgimento da Resolução Normativa Nº 16, criada pela CTNBio em janeiro de 2018, a fim de estabelecer os requisitos técnicos para apresentação de consulta à CTNBio sobre as Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMP), que englobam as Novas Tecnologias de Melhoramento (NTMs), dentro das quais encontra-se o RNAi uso tópico/sistêmico [uso de RNA fita dupla - "dsRNA" - com sequência homóloga ao(s) gene(s) alvo para silenciamento específico desse(s) gene(s)] (CTNBio, 2022).

5.4. Conclusões

A condução deste trabalho permitiu a identificação do gene da enzima RNaseIII de *Pantoea agglomerans* 33.1, que atua na degradação de moléculas de dsRNA. Foi possível realizar o *knockout* do gene *rnc*, que codifica a proteína em questão, e demonstrar que não afetou a sobrevivência, viabilidade e capacidade de crescimento do microrganismo. Além disso, a capacidade de colonizar os tecidos de cana-de-açúcar e promover o crescimento vegetal de seu hospedeiro não foi comprometida após a interrupção do gene *rnc*. Por último, o *knockout* possibilitou o acúmulo de dsRNA referente ao gene-alvo do inseto, *D. saccharalis*, no hospedeiro bacteriano. Desta forma, a utilização de *P. agglomerans* 33.1 Δ *rnc* como vetor de entrega RNAi para o controle de insetos-praga, demonstra-se uma alternativa promissora, podendo contribuir para a proteção e promoção de crescimento de diversas culturas

agronômicas relevantes que compõe sua rede de hospedeiros, aquém da cana-de-açúcar.

Referências

- Adesemoye, A. O., & Egamberdieva, D. (2013). Beneficial effects of plant growth-promoting rhizobacteria on improved crop production: prospects for developing economies. In *Bacteria in agrobiolgy: Crop productivity* (pp. 45-63). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221, 36-49.
- Akey, D. L., & Berger, J. M. (2005). Structure of the nuclease domain of ribonuclease III from *M. tuberculosis* at 2.1 Å. *Protein Science*, 14, 2744-2750.
- Araújo, W. L., Marcon, J., Maccheroni Jr, W., Van Elsas, J. D., Van Vuurde, J. W., & Azevedo, J. L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4906-4914.
- Arpaia, S., Birch, A. N. E., Kiss, J., van Loon, J. J., Messéan, A., Nuti, M., ... & Tebbe, C. C. (2017). Assessing environmental impacts of genetically modified plants on non-target organisms: the relevance of in planta studies. *Science of the Total Environment*, 583, 123-132.
- Asis Jr, C. A., & Adachi, K. (2004). Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 19-23.
- Axtell, M. J., Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2011). Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology*, 12, 1-13.
- Azevedo, J. L., & Quecine, M. C. (2019). Biodiversity and biotechnological applications of microorganisms associated with tropical plants. In *Microbiome in plant health and disease* (pp. 293-313). Springer, Singapore.
- Azevedo, J. L.; Araújo, W. L. (2007). Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli, B. N.; Deshmukh, S. K. (Org.). *Fungi: multifaceted microbes*. Boca Raton: CRC Press, 189-207.
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., ... & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 1473.
- Baldwin, R. L., & Zimm, B. H. (2000). Are denatured proteins ever random coils?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 12391-12392.
- Bally, J., Fishilevich, E., Bowling, A. J., Pence, H. E., Narva, K. E., & Waterhouse, P. M. (2018). Improved insect-proofing: expressing double-stranded RNA in chloroplasts. *Pest Management Science*, 74, 1751-1758.
- Bardin, S. D., Huang, H. C., Liu, L., & Yanke, L. J. (2003). Control, by microbial seed treatment, of damping-off caused by *Pythium* sp. on canola, safflower, dry pea, and sugar beet. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25, 268-275.
- Blaszczuk, J., Gan, J., Tropea, J. E., Court, D. L., Waugh, D. S., & Ji, X. (2004). Noncatalytic assembly of ribonuclease III with double-stranded RNA. *Structure*, 12, 457-466.
- Blaszczuk, J., Tropea, J. E., Bubunencko, M., Routzahn, K. M., Waugh, D. S., Court, D. L., & Ji, X. (2001). Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure*, 9, 1225-1236.

- Bonaterra, A., Mari, M., Casalini, L., & Montesinos, E. (2003). Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 93-104.
- Braasch, D. A., Jensen, S., Liu, Y., Kaur, K., Arar, K., White, M. A., & Corey, D. R. (2003). RNA interference in mammalian cells by chemically modified RNA. *Biochemistry*, 42, 7967-7975.
- Bram, R. J., Young, R. A., & Steitz, J. A. (1980). The ribonuclease III site flanking 23S sequences in the 30S ribosomal precursor RNA of *E. coli*. *Cell*, 19(2), 393-401.
- Brinkman, F. S., & Leipe, D. D. (2001). Phylogenetic analysis. *Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins*, 2, 349.
- Buchan, D. W., Minneci, F., Nugent, T. C., Bryson, K., & Jones, D. T. (2013). Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research*, 41, W349-W357.
- Chebotar, V. K., Malfanova, N. V., Shcherbakov, A. V., Ahtemova, G. A., Borisov, A. Y., Lugtenberg, B., & Tikhonovich, I. A. (2015). Endophytic bacteria in microbial preparations that improve plant development. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51, 271-277.
- Christiaens, O., Dzhambazova, T., Kostov, K., Arpaia, S., Joga, M. R., Urru, I., ... & Smagghe, G. (2018). Literature review of baseline information on RNAi to support the environmental risk assessment of RNAi-based GM plants. *EFSA Supporting Publications*, 15, 1424E.
- Coleman-Derr, D., Desgarenes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., ... & Tringe, S. G. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist*, 209, 798-811.
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 669-678.
- Conrad, C., & Rauhut, R. (2002). Ribonuclease III: new sense from nuisance. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34, 116-129.
- Conrad, C., & Rauhut, R. (2002). Ribonuclease III: new sense from nuisance. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34, 116-129.
- CTNBio. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018. Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br/resolucoes-normativas/-/asset_publisher/OgW431Rs9dQ6/content/resolucao-normativa-n%C2%BA-16-de-15-de-janeiro-de-2018>. Acesso em: 18 de setembro de 2022.
- Dastager, S. G., Deepa, C. K., Puneet, S. C., Nautiyal, C. S., & Pandey, A. (2009). Isolation and characterization of plant growth-promoting strain *Pantoea* NII-186. From Western Ghat Forest soil, India. *Letters in Applied Microbiology*, 49, 20-25.
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 6640-6645.
- Dávalos, A., Henriques, R., Latasa, M. J., Laparra, M., & Coca, M. (2019). Literature review of baseline information on non-coding RNA (ncRNA) to support the risk assessment of ncRNA-based genetically modified plants for food and feed. *EFSA Supporting Publications*, 16, 1688E.
- Dong, Z., Canny, M. J., McCully, M. E., Roboredo, M. R., Cabadilla, C. F., Ortega, E., & Rodes, R. (1994). A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (a new role for the apoplast). *Plant Physiology*, 105, 1139-1147.

- Dubrovina, A. S., & Kiselev, K. V. (2019). Exogenous RNAs for gene regulation and plant resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 2282.
- Dunn, J. J. (1976). RNase III cleavage of single-stranded RNA. Effect of ionic strength on the fidelity of cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, 251(12), 3807-3814.
- Eamens, A., Wang, M. B., Smith, N. A., & Waterhouse, P. M. (2008). RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiology*, 147, 456-468.
- Elvira-Recuenco, M., & Van Vuurde, J. W. L. (2000). Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 1036-1041.
- EPA. U.S. Environmental Protection Agency. (2013). White Paper on RNAi Technology As A Pesticide: Problem Formulation For Human Health And Ecological Risk Assessment. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, p. 39. Disponível em: <https://www.thecre.com/premium/wp-content/upl>. Acesso em: 10 de setembro de 2022.
- Factor, B. G., Bento, F. M. M., & Figueira, A. (2022). Methods for Delivery of dsRNAs for Agricultural Pest Control: The Case of Lepidopteran Pests. In *RNAi Strategies for Pest Management* (pp. 317-345). Humana, NY.
- FIFRA. Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act. (2014). Scientific Advisory Panel Meeting, A Set of Scientific Issues Being Considered by the Environmental Protection Agency regarding RNAi Technology: Problem Formulation for Human Health and Ecological Risk Assessment. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, p. 75.
- Fraser, A. G., Kamath, R. S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., & Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, 408, 325.
- Gan, D., Zhang, J., Jiang, H., Jiang, T., Zhu, S., & Cheng, B. (2010). Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. *Plant Cell Reports*, 29, 1261-1268.
- Geourjon, C., & Deleage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Bioinformatics*, 11, 681-684.
- Gitelman, D. R., & Apirion, D. (1980). The synthesis of some proteins is affected in RNA processing mutants of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 96, 1063-1070.
- Goodfellow, S., Zhang, D., Wang, M. B., & Zhang, R. (2019). Bacterium-mediated RNA interference: Potential application in plant protection. *Plants*, 8, 572.
- Grunberg-Manago, M. (1999). Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annual Review of Genetics*, 33, 193-227.
- Gunasinghe, R. N., Ikiriwatte, C. J., & Karunaratne, A. M. (2004). The use of *Pantoea agglomerans* and *Flavobacterium* sp. to control banana pathogens. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79, 1002-1006.
- Guo, Q., Liu, Q., A Smith, N., Liang, G., & Wang, M. B. (2016). RNA silencing in plants: mechanisms, technologies and applications in horticultural crops. *Current Genomics*, 17, 476-489.
- Guruprasad, K., Reddy, B. B., & Pandit, M. W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection*, 4, 155-161.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., & Mitaku, S. (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14, 378-379.

- Holoch, D., & Moazed, D. (2015). Small-RNA loading licenses Argonaute for assembly into a transcriptional silencing complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22, 328-335.
- Hsieh, T. F., Huang, H. C., & Erickson, R. S. (2005). Biological control of bacterial wilt of bean using a bacterial endophyte, *Pantoea agglomerans*. *Journal of Phytopathology*, 153, 608-614.
- Huang, L., Jin, J., Deighan, P., Kiner, E., McReynolds, L., & Lieberman, J. (2013). Efficient and specific gene knockdown by small interfering RNAs produced in bacteria. *Nature Biotechnology*, 31, 350-356.
- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., De Castro, E., Langendijk-Genevaux, P. S., ... & Sigrist, C. J. (2006). The PROSITE database. *Nucleic Acids Research*, 34, D227-D230.
- Ikai, A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *The Journal of Biochemistry*, 88(6), 1895-1898.
- ISAAA, GM Approval Database. Disponível em: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>. Acesso em: 10 de setembro de 2022.
- Jeun, Y. C., Park, K. S., Kim, C. H., Fowler, W. D., & Kloepper, J. W. (2004). Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological Control*, 29, 34-42.
- Keates, A. C., Fruehauf, J., Xiang, S., & Li, C. J. (2008). Trans Kingdom RNA interference: a bacterial approach to challenges in RNAi therapy and delivery. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 25, 113-128.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305, 567-580.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W. L., Mendes, R., Geraldi, I. O., Pizzirani-Kleiner, A. A., & Azevedo, J. L. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 6, 1244-1251.
- Langenberg, W. G., Zhang, L., Giunchedi, L., & Mitra, A. (1997). Transgenic tobacco plants expressing the bacterial *mc* gene resist virus infection. *Molecular Breeding*, 3, 391-399.
- Liu, H., Carvalhais, L. C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P. G., Pieterse, C. M., & Schenk, P. M. (2017). Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2552.
- Loiret, F. G., Ortega, E., Kleiner, D., Ortega-Rodés, P., Rodes, R., & Dong, Z. (2004). A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 504-511.
- Lorenz, M. G., & Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews*, 58, 563-602.
- Lubec, G., Afjehi-Sadat, L., Yang, J. W., & John, J. P. P. (2005). Searching for hypothetical proteins: theory and practice based upon original data and literature. *Progress in Neurobiology*, 77, 90-127.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556.
- Lundgren, J. G., & Duan, J. J. (2013). RNAi-based insecticidal crops: potential effects on nontarget species. *Bioscience*, 63, 657-665.
- Ma, Y., Prasad, M. N. V., Rajkumar, M., & Freitas, H. J. B. A. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*, 29, 248-258.

- Malboobi, M. A., Behbahani, M., Madani, H., Owlia, P., Deljou, A., Yakhchali, B., ... & Hassanabadi, H. (2009a). Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1479-1484.
- Malboobi, M. A., Owlia, P., Behbahani, M., Sarokhani, E., Moradi, S., Yakhchali, B., ... & Heravi, K. M. (2009b). Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1471-1477.
- Marrone, P. G. (2014). The market and potential for biopesticides. In *Biopesticides: state of the art and future opportunities* (pp. 245-258). American Chemical Society.
- Marrone, P. G. (2019). Pesticidal natural products—status and future potential. *Pest Management Science*, 75, 2325-2340.
- McGinnis, K. M. (2010). RNAi for functional genomics in plants. *Briefings in Functional Genomics*, 9, 111-117.
- McInroy, J. A., & Kloeppe, J. W. (1995). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*, 173, 337-342.
- Mei, C., & Flinn, B. S. (2010). The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. *Recent Patents on Biotechnology*, 4, 81-95.
- Mendelsohn, M. L., Gathmann, A., Kardassi, D., Sachana, M., Hopwood, E. M., Dietz-Pfeilstetter, A., ... & Székács, A. (2020). Summary of discussions from the 2019 OECD conference on RNAi based pesticides. *Frontiers in Plant Science*, 11, 740.
- Micura, R. (2002). Small interfering RNAs and their chemical synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 41, 2265-2269.
- Miliute, I., Buzaite, O., Baniulis, D., & Stanys, V. (2015). Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 102, 465-478.
- Mitchell, A., Chang, H. Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., ... & Sangrador-Vegas, A. (2014). The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Research*, 43, D213-D221.
- Morinaka, Y., Sakamoto, T., Inukai, Y., Agetsuma, M., Kitano, H., Ashikari, M., & Matsuoka, M. (2006). Morphological alteration caused by brassinosteroid insensitivity increases the biomass and grain production of rice. *Plant Physiology*, 141, 924-931.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-97.
- Nashimoto, H., & Uchida, H. (1985). DNA sequencing of the *Escherichia coli* ribonuclease III gene and its mutations. *Molecular and General Genetics*, 201, 25-29.
- Nikolaev, N.; Schlessinger, D.; Wellauer, PKJ. 1974. 30 S pre-ribosomal RNA of *Escherichia coli* and products of cleavage by ribonuclease III: length and molecular weight. *Journal of Molecular Biology*, 86, 741-747.
- Obbard, D. J., Gordon, K. H., Buck, A. H., & Jiggins, F. M. (2009). The evolution of RNAi as a defense against viruses and transposable elements. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 99-115.
- Ongena, M. A. R. C., Daayf, F., Jacques, P., Thonart, P., Benhamou, N., Paulitz, T. C., & Bélanger, R. R. (2000). Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. *Plant Pathology*, 49, 523-530.
- Paces, J., Nic, M., Novotny, T., & Svoboda, P. (2017). Literature review of baseline information to support the risk assessment of RNAi-based GM plants. *EFSA Supporting Publications*, 14, 1246E.
- Petersen, TN.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8, 785-786.

- Plaza, P., Usall, J., Smilanick, J. L., Lamarca, N., & Vinas, I. (2004). *Combining Pantoea agglomerans* (CPA-2) and curing treatments to control established infections of *Penicillium digitatum* on lemons. *Journal of Food Protection*, 67, 781-786.
- Procópio, R. E. L. (2004). Diversidade bacteriana endofítica de *Eucalyptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico. Doutorado (Tese), Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Quecine, M. C., Araújo, W. L. D., Tsui, S., Parra, J. R. P., Azevedo, J. L. D., & Pizzirani-Kleiner, A. A. (2014). Control of *Diatraea saccharalis* by the endophytic *Pantoea agglomerans* 33.1 expressing cry1Ac7. *Archives of Microbiology*, 196, 227-234.
- Quecine, M. C., Araújo, W. L., Rossetto, P. B., Ferreira, A., Tsui, S., Lacava, P. T., ... & Pizzirani-Kleiner, A. A. (2012). Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 7511-7518.
- Quecine, M. C., Silva, T. M., Carvalho, G., Saito, S., Mondin, M., Teixeira-Silva, N. S., ... & Monteiro-Vitorello, C. B. (2016). A stable *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* GFP-tagged strain reveals a new colonization niche in sugarcane tissues. *Plant Pathology*, 65, 154-162.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2017.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., & Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, 20, 1-11.
- Rampelotti-Ferreira, F. T., Ferreira, A., Vendramim, J. D., Lacava, P. T., Azevedo, J. L., & Araújo, W. L. (2010). Colonization of rice and *Spodoptera frugiperda* JE Smith (Lepidoptera: Noctuidae) larvae by genetically modified endophytic *Methylobacterium mesophilicum*. *Neotropical Entomology*, 39, 308-310.
- Rauhut, R., Andreas, J., Conrad, C., & Klug, G. (1996). Identification and analysis of the rnc gene for RNase III in *Rhodobacter capsulatus*. *Nucleic acids research*, 24(7), 1246-1251.
- Régnier, P., & Grunberg-Manago, M. (1989). Cleavage by RNase III in the transcripts of the metY-nusA-infB operon of *Escherichia coli* releases the tRNA and initiates the decay of the downstream mRNA. *Journal of Molecular Biology*, 210, 293-302.
- Regnier, P., & Grunberg-Manago, M. (1990). RNase III cleavages in non-coding leaders of *Escherichia coli* transcripts control mRNA stability and genetic expression. *Biochemistry*, 72, 825-834.
- Robertson, H. D., Webster, R. E., & Zinder, N. D. (1967). A nuclease specific for double-stranded RNA. *Virology*, 32, 718.
- Robertson, H. D., Webster, R. E., & Zinder, N. D. (1968). Purification and properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 243, 82-91.
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8), 827-837.
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 19, 827-837.
- Rost, B., Yachdav, G., & Liu, J. (2004). The predict protein server. *Nucleic acids research*, 32, W321-W326.
- Ruppel, S., Hecht-Buchholz, C., Remus, R., Ortmann, U., & Schmelzer, R. (1992). Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. *Plant and Soil*, 145, 261-273.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., & Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 278, 1-9.

- Saleh, M. C., Van Rij, R. P., & Andino, R. (2004). RNA silencing in viral infections: insights from poliovirus. *Virus Research*, 102, 11-17.
- Senthilkumar, M., Anandham, R., Madhaiyan, M., Venkateswaran, V., & Sa, T. (2011). Endophytic bacteria: perspectives and applications in agricultural crop production. In *Bacteria in agrobiolgy: crop ecosystems* (pp. 61-96). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Sergeeva, E., Hirkala, D. L., & Nelson, L. M. (2007). Production of indole-3-acetic acid, aromatic amino acid aminotransferase activities and plant growth promotion by *Pantoea agglomerans* rhizosphere isolates. *Plant and Soil*, 297, 1-13.
- Sessitsch, A. N. G. E. L. A., Hardoim, P. A. B. L. O., Döring, J., Weilharter, A., Krause, A. N. D. R. E. A. S., Woyke, T. A. N. J. A., ... & Reinhold-Hurek, B. (2012). Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 28-36.
- Shishido, M., Breuil, C., & Chanway, C. P. (1999). Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 29, 191-196.
- Sohail, M., Doran, G., Riedemann, J., Macaulay, V., & Southern, E. M. (2003). A simple and cost-effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy. *Nucleic Acids Research*, 31, e38-e38.
- Steege, D. A. (2000). Emerging features of mRNA decay in bacteria. *RNA*, 6, 1079-1090.
- Sturz, A. V., & Matheson, B. G. (1996). Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. *Plant and Soil*, 184, 265-271.
- Sturz, A. V., & Nowak, J. (2000). Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, 15, 183-190.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., & Nowak, J. (2000). Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19, 1-30.
- Sulbarán, M., Pérez, E., Ball, M. M., Bahsas, A., & Yarzabal, L. A. (2009). Characterization of the mineral phosphate-solubilizing activity of *Pantoea agglomerans* MMB051 isolated from an iron-rich soil in southeastern Venezuela (Bolivar state). *Current Microbiology*, 58, 378-383.
- Suman, A., Gaur, A., Shrivastava, A. K., & Yadav, R. L. (2005). Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Plant Growth Regulation*, 47, 155-162.
- Takiff, H. E., & Chen, S. M. (1989). Genetic analysis of the rnc operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 171, 2581-2590.
- Takiff, H. E., Chen, S. M., & Court, D. L. (1989). Genetic analysis of the rnc operon of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 171, 2581-2590.
- Tang, G., Galili, G., & Zhuang, X. (2007). RNAi and microRNA: breakthrough technologies for the improvement of plant nutritional value and metabolic engineering. *Metabolomics*, 3, 357-369.
- Taning, C. N., Arpaia, S., Christiaens, O., Dietz-Pfeilstetter, A., Jones, H., Mezzetti, B., ... & Smagghe, G. (2020). RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market. *Pest Management Science*, 76, 841-845.
- Tenllado, F., Martínez-García, B., Vargas, M., & Díaz-Ruíz, J. R. (2003). Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnology*, 3, 1-11.
- Thomas, P., & Sekhar, A. C. (2014). Live cell imaging reveals extensive intracellular cytoplasmic colonization of banana by normally non-cultivable endophytic bacteria. *AoB Plants*, 6.

- Timmons, L., Court, D. L., & Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263, 103-112.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., Botina, S. G., & Netrusov, A. I. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research*, 162, 69-76.
- Van Rij, R. P., & Andino, R. (2006). The silent treatment: RNAi as a defense against virus infection in mammals. *Trends in Biotechnology*, 24, 186-193.
- Vatanparast, M., & Kim, Y. (2017). Optimization of recombinant bacteria expressing dsRNA to enhance insecticidal activity against a lepidopteran insect, *Spodoptera exigua*. *PLoS One*, 12, e0183054.
- Vega, F. E., Pava-Ripoll, M., Posada, F., & Buyer, J. S. (2005). Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 45, 371-380.
- Venema, J., & Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*, 33, 261-311.
- Verma, S. C., Ladha, J. K., & Tripathi, A. K. (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 91, 127-141.
- Verma, S. C., Singh, A., Chowdhury, S. P., & Tripathi, A. K. (2004). Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnology Letters*, 26, 425-429.
- Walterson, A. M., & Stavrinides, J. (2015). *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), 968-984.
- Wang, H. W., Noland, C., Siridechadilok, B., Taylor, D. W., Ma, E., Felderer, K., ... & Nogales, E. (2009). Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16, 1148-1153.
- Wang, W., & Bechhofer, D. H. (1997). *Bacillus subtilis* RNase III gene: cloning, function of the gene in *Escherichia coli*, and construction of *Bacillus subtilis* strains with altered *rnc* loci. *Journal of Bacteriology*, 179, 7379-7385.
- Whitten, M. M., Facey, P. D., Del Sol, R., Fernández-Martínez, L. T., Evans, M. C., Mitchell, J. J., ... & Dyson, P. J. (2016). Symbiont-mediated RNA interference in insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283, 20160042.
- Wu, H., Xu, H., Miraglia, L. J., & Croke, S. T. (2000). Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 36957-36965.
- Xiang, S., Keates, A. C., Fruehauf, J., Yang, Y., Guo, H., Nguyen, T., & Li, C. J. (2009). In vitro and in vivo gene silencing by Trans Kingdom RNAi (tkRNAi). In *siRNA and miRNA Gene Silencing* (pp. 1-14). Humana Press.
- Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., ... & Brinkman, F. S. (2010). PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, 26, 1608-1615.
- Zhang, J., Khan, S. A., Hasse, C., Ruf, S., Heckel, D. G., & Bock, R. (2015). Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science*, 347, 991-994.
- Zimmer, W., Hundeshagen, B., & Niederau, E. (1994). Demonstration of the indolepyruvate decarboxylase gene homologue in different auxin-producing species of the Enterobacteriaceae. *Canadian Journal of Microbiology*, 40, 1072-1076.

Zotti, M., Dos Santos, E. A., Cagliari, D., Christiaens, O., Taning, C. N. T., & Smagghe, G. (2018). RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Management Science*, 74, 1239-1250.