Pietro Enrico Vicari Vento

Efeitos pleiotrópicos de genes da determinação sexual em aspectos reprodutivos de *Anastrepha* sp.1 affinis *fraterculus* (Diptera, Tephritidae)

Pleiotropic effects of sex determination genes on sexual aspects of *Anastrepha* sp.1 affinis *fraterculus* (Diptera, Tephritidae)

São Paulo

2021

Pietro Enrico Vicari Vento

Efeitos pleiotrópicos de genes da determinação sexual em aspectos reprodutivos de *Anastrepha* sp.1 affinis *fraterculus* (Diptera, Tephritidae)

Pleiotropic effects of sex determination genes on sexual aspects of *Anastrepha* sp.1 affinis *fraterculus* (Diptera, Tephritidae)

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

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

São Paulo

2021

Vicari, Pietro Enrico
Efeitos pleiotrópicos dos genes da determinação sexual em aspectos reprodutivos de *Anastrepha* sp.1 affinis *fraterculus* (Diptera, Tephritidae) / Pietro Enrico Vicari; orientadora Denise Selivon Scheepmaker – São Paulo, 2021.
84 p.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Evolutiva.

1. moscas-das-frutas. 2. Desenvolvimento. 3. Determinação sexual. 4. Pleiotropia. I. Scheepmaker, Denise Selivon, orient. II. Título.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof^{a}. Dr.^{a}. Denise S. Scheepmaker
Orientadora

A professora Denise, que sempre me inspirou com sua história de superação e amizade.

"But in the end, it's only a passing thing, this shadow. Even darkness must pass. A new day will come. And when the sun shines it will shine out the clearer."

J.R.R Tolkien

Agradecimentos

Agradeço a Prof.ª Denise Selivon,
por esses 11 anos de paciência, orientação, parceria e amizade.

Ao Prof. André Perondini,
por suas incríveis contribuições aos trabalhos que desenvolvi e suas histórias.

Ao Dr. Lucas Sánchez,
pela inspiração inicial e pela proveitosa discussão do trabalho.

Ao Dr. Mathew Rockman,
pelas importantes contribuições sobre de pleiotropia e pelo incentivo a esse trabalho.

À M.ª Ester Chang,
que me acompanhou em todos os momentos dessa jornada, com muita alegria e bom-humor.

Ao Dr. Ighor Teixeira,
por tantas discussões técnicas e acadêmicas que foram fundamentais para este trabalho.

À Dr.ª Paula Perre,
pelas conversas, por compartilhar comigo um pouco da sua rotina e forma de trabalhar e pelo café delicioso.

Ao Dr. Bruno Rossini,
pelos treinamentos em técnicas de Biologia Molecular.

Aos colegas Rebeca, Márcio e Cristiano
que tornaram a rotina e o dia a dia no laboratório mais leve e proveitoso.

À Prof.ª Tatiana Torres,
pelos seus pareceres sempre muito construtivos e pela sua sensibilidade enquanto coordenadora da CCP quando necessário.

Ao técnico Carlos,
por propiciar as condições necessárias para o desenvolvimento do trabalho, mantendo a criação das moscas, além de estar sempre disposto a ajudar.

À Alana,
que esteve ao meu lado mesmo nas horas mais escuras, de onde tirei forças para seguir em frente.

A minha família e amigos,
que com seu apoio sempre incondicional sempre incentivaram a execução deste desafio mesmo quando tudo parecia distante.

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e ao Instituto de Biociências, e todo seu pessoal,
que forneceram toda estrutura necessária para desenvolvimento do trabalho.

Apoio financeiro,

Bolsa institucional de doutorado – CAPES nº 1625779

FAPESP Proc. nº 2016/00782-7

Índice

I – Introdução 10

II – Objetivos 18

III – Materiais e Métodos 19

III.1 Material biológico 19

III.2 Produção do dsRNA 20

III.2.1 Seleção e teste dos iniciadores 20

III.2.2 Síntese dos dsRNA 22

III.2.3 Testes de expressão 24

III.3 Fecundidade e fertilidade 25

III.4 Tamanho dos ovos 28

III.5 Morfologia das gônadas 29

III.6 Comportamento reprodutivo 30

III.7 Efeito materno 33

III.8 Análises estatísticas 34

IV – Resultados 35

IV.1 Produção do dsRNA 35

IV.1.1 Seleção e teste dos iniciadores 35

IV.1.2 Síntese dos dsRNA 38

IV.1.3 Testes de expressão 42

IV.2 Fecundidade e fertilidade 44

IV.3 Tamanho dos ovos 46

IV.4 Desenvolvimento das gônadas 49

IV.5 Comportamento reprodutivo 53

IV.6 Efeito materno 58

IV.7 Resumo dos resultados obtidos 60

V – Discussão 61

VI – Conclusões 74

Resumo 75

Abstract 76

Referências Bibliográficas 77

I - Introdução

As moscas-das-frutas compõem uma família (Tephritidae) com mais de 4000 espécies descritas e que ocorrem em todos os continentes do planeta, exceto a Antártica. Como característica comum essas espécies têm o hábito de colocar seus ovos diretamente no interior de tecidos vegetais vivos, sendo que as moscas-das-frutas utilizam frutos para esse propósito. Neste caso, suas larvas eclodem no interior dos frutos e ali se desenvolvem, se alimentando dos tecidos vegetais vivos. Isso danifica os frutos, causando seu apodrecimento precoce, além de permitir a entrada de diversos patógenos através dos orifícios por onde os ovos foram depositados (Machota *et al.*, 2016). Como alguns de seus hospedeiros são espécies cultivadas, algumas moscas-das-frutas são consideradas pragas da fruticultura mundial. Dentre as espécies de maior importância econômica na região Neotropical destacam-se as espécies do complexo *Anastrepha fraterculus.* Trata-se de um conjunto de espécies crípticas (Selivon, 1996; Selivon & Perondini, 1998; Selivon *et al.*, 1999, 2004, 2005), sendo que no Brasil ocorrem pelo menos três espécies distintas: *A.* sp.1 *affinis fraterculus*, *A.* sp.2 *aff. fraterculus* e *A.* sp.3 *aff. fraterculus.* Análises morfológicas e moleculares revelam que existem pelo menos 8 espécies distintas na região Neotropical (Hernandez-Ortiz *et al.*, 2004, 2012, 2015; Prezotto, 2008; Sutton *et al.*, 2015).

Como são pragas de importância econômica e devido ao postulado de especiação recente desse grupo (Rezende *et al.*, 2016; Diaz *et al.*, 2018), as espécies de *Anastrepha* despertam grande interesse na comunidade científica internacional, tanto de uma perspectiva aplicada quanto por diversos aspectos de sua biologia básica e de sua evolução. Muitos dos estudos recentes têm se concentrado na compreensão dos mecanismos pelos quais se deu a evolução deste gênero e na caracterização das espécies do complexo *fraterculus* (Rull *et al.*, 2012, 2013; Brízová *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2013; Oroño *et al.*, 2013; Abraham

et al., 2014; Devescovi *et al.*, 2014). Dentre os aspectos estudados um que desperta grande interesse tanto do ponto de vista ontogenético quanto evolutivo se refere à determinação sexual desses insetos (Ruíz *et al.*, 2005, 2007a, 2007b; Sarno *et al.*, 2010).

O termo determinação sexual se refere à regulação e a evolução do desenvolvimento de características sexuais, que resultam em dimorfismos sexuais que desempenham importante papel na biologia e na evolução dos animais. Os sistemas de determinação sexual usam diferentes genes e mecanismos reguladores para estabilizar o desenvolvimento dos fenótipos masculinos e feminino nas diferentes espécies (Gempe & Beye, 2011). Em insetos, essa determinação está relacionada a expressão diferencial de uma cascata de genes que é relativamente conservada, sendo que genes ortólogos podem ser identificados em diferentes grupos de insetos com funções mais ou menos semelhantes (Verhlust *et al.*, 2010; Gempe & Beye, 2011).

O funcionamento dessa cascata em *Anastrepha* é conhecido (Fig. 1): o gene *transformer* (*tra*) fornece o dispositivo de memória da determinação sexual através de sua função auto-regulatória (Ruiz *et al.*, 2007b). Nas fêmeas (XX), supõem-se que a proteína Tra materna atue nos embriões regulando o *splicing* sexo-específico do gene *tra* durante os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, enquanto sua função auto-regulatória ainda não está estabelecida (Ruiz *et al.*, 2007b). Dessa forma, as fêmeas traduzem uma proteína Tra funcional. O cromossomo Y do tefritídeo *Ceratitis capitata* carrega um fator masculinizante (fator M) que determina o desenvolvimento do sexo masculino por reprimir direta ou indiretamente a função embrionária do gene *tra* (Willhofet & Franz, 1996; Pane *et al*., 2002). A natureza molecular do fator M de *C. capitata* e de quatro espécies de *Bactrocera* foi identificada e o gene denominado *Maleness-on-the-Y* (*MoY*) (Mecariello *et al.*, 2019). Imagina-se que esse fator também exista e atue de modo semelhante em outros gêneros de tefritídeo frugívoros (Sánchez, 2008). Desse modo, nos machos a proteína Tra materna não

atua, o que leva à produção de um transcrito de RNAm com um códon de término da tradução precoce, resultando na produção de proteína Tra não funcional (Ruíz *et al.*, 2007b).

Como em outros insetos, o produto do gene *tra* e o produto do gene *transformer-2* (*tra*-2) são responsáveis por controlar o *splicing* sexo-específico do produto do gene *doublesex* (*dsx*) (Hedley & Maniatis, 1991; Hertel *et al.*, 1996; Ryner & Baker, 1991; Tian & Maniatis, 1993; Ruiz *et al.*, 2007a; Sarno *et al.*, 2010) que dá origem a duas proteínas distintas nos diferentes sexos, Dsx^M e Dsx^F (Ruiz *et al.*, 2005, 2007a). Essas proteínas são fatores de transcrição que regulam a expressão dos genes de citodiferenciação sexual (Burtis & Baker, 1989; Hoshijima *et al.*, 1991). É a expressão desses genes que faz com que um embrião apresente o desenvolvimento dos fenótipos masculino ou feminino.

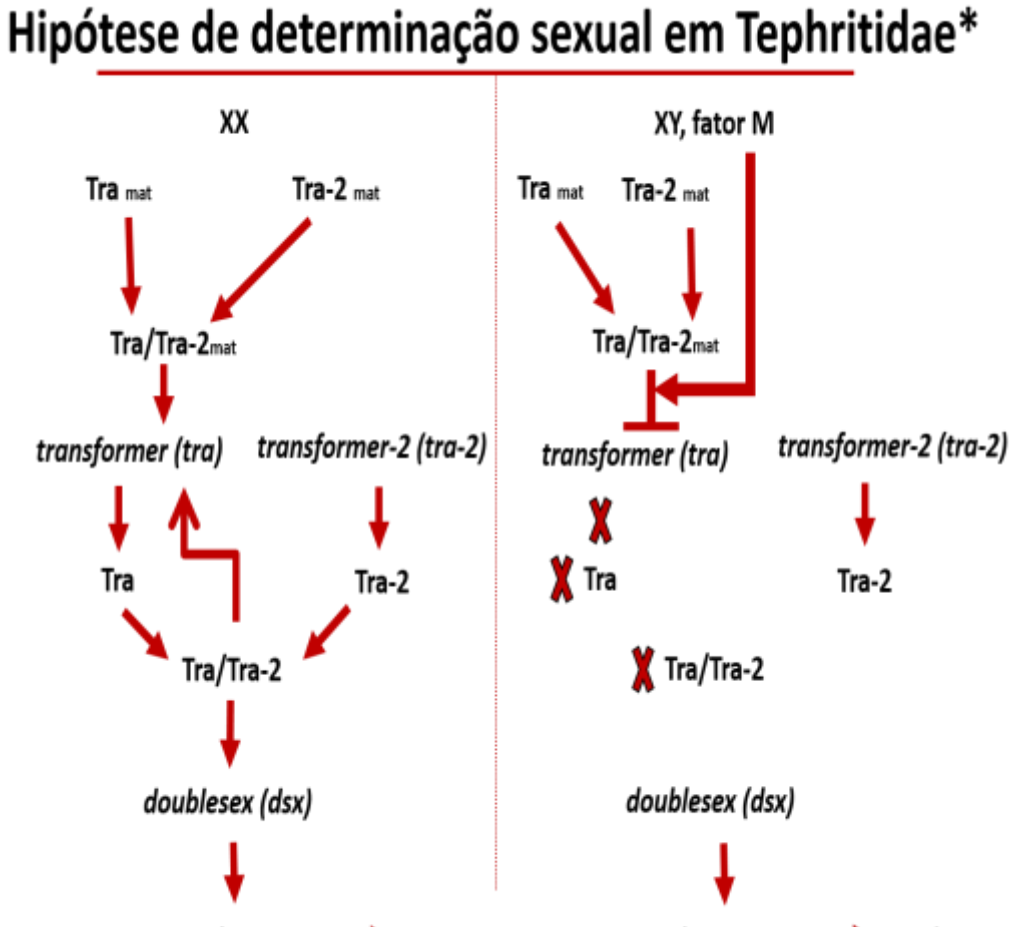


Figura 1 - Hipótese atual do funcionamento da cascata genética de determinação sexual em Tephritidae (Diptera). * modificado de Sarno e col. (2010)

Através de estudos recentes que usaram da técnica de RNAi passou-se a conhecer uma série de efeitos dos genes *tra* e *tra-2* nas moscas-das-frutas em uma perspectiva experimental. Dentre os efeitos relatados se destaca a transformação de fêmeas genotípicas em pseudomachos (XX) estéreis a partir da injeção de dsRNA de *tra* e/ou *tra-2* em embriões (Sarno *et al.*, 2010; Schetelig *et al.*, 2012) ou nos parentais de *Anastrepha* (Vicari *et al.*, 2021) *e* em *Bactrocera dorsalis* (Liu *et al.*, 2015). Nesses casos, na ausência das proteínas Tra e/ou Tra-2 funcionais nas fêmeas, ocorre uma alteração do padrão de *splicing* dos genes *tra* e *dsx*, que passam a ser processados com o padrão típico de machos. Por isso, indivíduos que são fêmeas genotípicas (XX) acabam por desenvolver o fenótipo masculino, os chamados pseudomachos – indivíduos com fenótipo masculino, mas que possuem os cromossomos sexuais femininos (XX). Com isso ocorre o desenvolvimento de um maior número relativo de machos, que pode chegar a valores próximos de 100% (Schetelig *et al.*, 2012).

Outras alterações em diversas características reprodutivas também foram relatadas nestes estudos. Machos F1 de fêmeas tratadas com dsRNA de *tra* e/ou *tra-2* apresentaram redução na fertilidade (Schetelig *et al.*, 2012; Vicari *et al*., 2021) e alterações no desenvolvimento dos testículos (Schetelig *et al.* 2012; Liu *et al.*, 2015; Vicari *et al*., 2021). Fêmeas adultas do tefritídeo *Bactrocera dorsalis* tratadas com dsRNA de *tra* apresentaram redução significativa na fecundidade (Peng *et al.*, 2015). Entretanto, nenhum desses estudos investigou de forma sistemática e detalhada essas outras alterações que vão além da determinação primária do sexo. A determinação do fenótipo sexual ocorre nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário dos tefritídeos (Morrow *et al.*, 2014). Apesar disso, os genes *tra*, *tra-2* e *dsx* são expressos em outros estágios ontogenéticos de *Anastrepha* (Ruiz *et al.*, 2005, 2007a, 2007b; Sarno *et al.*, 2010) e é possível que estejam relacionados a estes outros aspectos reprodutivos relatados nas imagos.

Além disso, sabe-se que a inibição da expressão da proteína Dsx^F está relacionada ao menor desenvolvimento dos ovários e na diminuição da fecundidade de fêmeas adultas de *B. dorsalis* (Chen *et al.*, 2008) e do lepidóptero *Corcyra caphalonica* (Passra *et al.*, 2014). Também são conhecidas alterações relacionadas ao comportamento sexual em outros insetos, como em *Drosophila*: fêmeas mutantes para o *tra* não só apresentam os tecidos desenvolvidos com características masculinas como apresentam comportamento típico de machos; já mutantes para *dsx* não apresentam tais alterações (McRobert & Tompkins, 1985). Machos ectopicamente expressando Dsx^F são cortejados por machos normais, o que indica que este pode estar associado a produção de feromônios (Waterburry *et al.*, 1999). O padrão de expressão de *dsx* no sistema nervoso de adultos é diferente nos sexos, e essa alteração deve se relacionar com as diferenças no comportamento reprodutivo desses animais (Rideout *et al.*, 2010).

Estes outros efeitos relacionados ao silenciamento dos genes de determinação sexual podem ser considerados efeitos pleiotrópicos. Todos os genes apresentam certo grau de pleiotropia, geralmente relacionados a uma organização modular, mas a maioria dos genes apresenta efeitos fenotípicos limitados (Stearns, 2010). O estudo dos efeitos pleiotrópicos dos genes pode prover importantes evidências sobre como se deu a evolução destes. Isso porque, de acordo com os modelos propostos, quanto maior o grau de pleiotropia mais estáveis são os genes ao longo do tempo, devido ao maior grau de seleção purificadora atuando sobre eles; genes com uma única função teriam maior propensão a acumular mutações que genes com várias funções (Marin & Baker, 1998). Isso porque uma mutação deletéria em um gene com alto grau de pleiotropia afetaria várias características, o que imporia um maior custo adaptativo. Desse modo, a pleiotropia exerceria resistência à mudança evolutiva (Marin & Baker, 1998; Stearns, 2010). Por serem genes reguladores que atuam sobre uma série de características relacionadas ao fenótipo sexual, seria esperado que os genes de determinação sexual de insetos fossem bastante conservados.

Porém estudos apontam que, ao menos em Diptera, as cascatas de determinação sexual evoluem muito rapidamente, em comparação com outras vias regulatórias (Schütt & Nöthiger, 2000).

A evolução da cascata de determinação sexual em insetos envolveu a aquisição de genes reguladores que foram sendo adicionados ao topo da cascata, que tem seus elementos da base como os mais antigos, traduzida como hipótese base-topo (Wilkins, 1995; Pomiankoswki *et al.*, 2004; Verhulst *et al.*, 2010; Eirin-López & Sánchez, 2015; Meisel, 2020; Adolfi *et al*., 2021). Um exemplo disso é o caso do gene *Sex-lethal* (*Sxl*). Esse gene foi cooptado através de seleção positiva para a função de determinação sexual em Drosophilidae, sendo que em outros insetos desempenha outras funções (Verhulst *et al.* 2010; Eirin-López & Sánchez, 2015). O *Sxl* passou a ser o regulador do topo da cascata, regulando o padrão de *splicing* do *tra* (Eirin-López & Sánchez, 2015). Sob esse modelo, é esperado que genes do topo da cascata apresentem maior variação entre os grupos de insetos, pois a manutenção de novas mutações seria favorecida por seleção positiva. Por outro lado, os genes da base se manteriam conservados ao longo do tempo, devido a seleção purificadora que atua mantendo a determinação dos fenótipos sexuais (Verhulst *et al.*, 2010).

Assim, na cascata de determinação sexual de insetos, os genes do topo seriam mais passíveis de mudanças ao longo do tempo, por terem uma única função (regular o gene logo abaixo deles), do que os genes da base, que controlam diretamente a expressão de outros genes, pois estes últimos teriam múltiplos efeitos (Marin & Baker, 1998). Entretanto, uma outra interpretação é possível, a chamada hipótese de restrições no desenvolvimento. Segundo essa hipótese, mutações nos genes envolvidos em aspectos mais iniciais do desenvolvimento (isto é, os do topo da cascata) teriam um custo adaptativo maior, pois mutações que ocorram neles afetariam a expressão dos genes que eles regulam. Nesse caso os genes do topo estariam sujeitos a níveis maiores de seleção purificadora,

enquanto os genes da base acomodariam melhor essas mudanças e, portanto, mudariam mais ao longo do tempo (Artieri *et al.*, 2009).

Como forma de elucidar quais destas interpretações estaria correta foi feita uma análise *in silico* a partir das sequências dos RNAm desses genes disponíveis em bancos de dados (Eirin-López & Sánchez, 2015). Nesta análise, foram consideradas 144 sequências de proteínas produzidas a partir dos genes *Sxl*, *tra*, *tra-2* e *dsx*, de 59 espécies diferentes, pertencentes a 6 ordens de insetos, incluindo 10 espécies de *Anastrepha*. Neste estudo verificou-se que, de forma geral, os genes da determinação do sexo evoluíram a taxas constantes, que são maiores que de outros genes analisados. Isso está de acordo com a ideia prévia de que os genes de determinação sexual evoluem de forma rápida nesses animais (Schütt & Nöthiger, 2000). Nesta análise (Eirin-López & Sánchez, 2015) conclui-se que os genes da base dessa cascata são mais diversos que os topo. Isso estaria de acordo com a segunda interpretação da evolução desta via, na qual os genes da base apresentariam maior variação (Artieri *et al*., 2009; Morrow *et al*., 2014). Entretanto, ainda segundo a análise, o gene *tra*, que corresponde ao topo da cascata na grande maioria das espécies analisadas, foi o que evoluiu mais rápido (Eirin-Lópex & Sánchez, 2015). É possível que o gene *tra* tenha suas regiões reguladoras, os domínios SR (ricos em serina-arginina, relacionados a interações proteína-proteína) conservadas, enquanto outras regiões evoluem de forma rápida (Eirin-López & Sánchez, 2015) ou que eles apresentem maior variação ao longo da evolução por serem menos pleiotrópicos (Marin & Baker, 1998).

Ou seja, esses resultados contraditórios da análise *in silico* (Eirin-López & Sánchez, 2015) representam uma inconsistência quanto a interpretação da evolução dessa via, pois não é possível determinar qual dos aspectos é preponderante na evolução desta cascata: a seleção conservando os genes base – no caso o *dsx*, por atuar na regulação direta de vários outros genes-, a seleção conservando os genes do topo – no caso o *tra*, pois mudanças neste afetariam toda a cascata- ou ambos, uma vez que a ocorrência destes fenômenos não seria

excludente. Entretanto, não há trabalhos que fomentem nenhuma dessas interpretações de uma perspectiva experimental, sendo que uma estimativa dos efeitos pleiotrópicos dos genes que constituem essa cascata poderia contribuir para testar se de fato esses fenômenos atuaram ao longo da evolução desses genes (Lucas Sánchez e Mattew Rockman, comunicação pessoal).

Nessa perspectiva, as moscas do gênero *Anastrepha* são um promissor caso a ser investigado, uma vez que são um grupo de espécies que constitui grande parte das análises *in silico* feitas até o momento (Eirin-López & Sánchez, 2015). Além disso, são conhecidas uma série de alterações relacionadas à expressão dos genes *tra*, *tra-2* e *dsx* em tefritídeos, como alterações morfológicas (Chen *et al.*, 2008, Schetelig *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015), alterações na fecundidade e na fertilidade (Schetelig *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2015; Vicari *et al.*, 2021) além de possíveis alterações comportamentais (Teixeira, 2017). Estas alterações compreendem caracteres que podem ser mensurados e comparados, de forma a testar se há variação nos graus das alterações fenotípicas relacionadas à expressão desses genes e, caso existam, se estes podem estar relacionados à evolução dessa cascata (Marin & Baker, 1998; Erin-López & Sánchez, 2015). Assim, o conhecimento dos efeitos pleiotrópicos dos genes da cascata de determinação sexual em insetos poderiam não só contribuir para o conhecimento mais profundo das funções destes, sobretudo as funções que desempenham em outros estágios do ciclo de vida desses insetos, mas também poderiam fornecer importantes evidências sobre como se deu a história evolutiva dessa cascata gênica.

Nesse estudo, buscou-se fazer uma análise dos efeitos pleiotrópicos em aspectos reprodutivos dos genes de determinação sexual (*tra*, *tra-2* e *dsx*) em uma espécie de *Anastrepha*, a fim de determinar qual das hipóteses para evolução dos genes da cascata de determinação possui mais evidência segundo essa abordagem.

II - Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos pleiotrópicos em aspectos reprodutivos dos genes envolvidos na cascata de determinação sexual de *Anastrepha* a fim de testar qual das hipóteses, base-topo ou restrições no desenvolvimento, melhor explicaria a evolução desses genes nesse grupo de insetos.

Objetivos específicos:

a) Sintetizar dsRNA dos genes *tra*, *tra-2* e *dsx* de *Anastrepha* sp.1 aff. *fraterculus;*
b) Injetar indivíduos adultos com solução de dsRNA dos genes *tra*, *tra-2* e *dsx*;
c) Analisar e comparar os efeitos de cada gene silenciado quanto a:
    1. Eficiência do silenciamento;
    2. Fertilidade e fecundidade das fêmeas;
    3. Tamanho dos ovos produzidos por fêmeas;
    4. Morfologia das gônadas em machos;
    5. Morfologia das gônadas em fêmeas;
    6. Comportamento reprodutivo de machos e fêmeas;
    7. Efeito materno.

III – Materiais e Métodos

III.1 Material Biológico

Todos os indivíduos de *Anastrepha sp.1* affinis *frateculus* (Fig. 2) utilizados neste estudo foram retirados a partir de uma colônia oriunda originalmente de Poços de Caldas, Minas Gerais (21º47’16’’S, 46º33’41’’O) e estabelecida no Laboratório de Estudos Evolutivos de Moscas-das-Frutas (IB-USP) há 3 anos a época da realização dos experimentos. Em todos os procedimentos descritos a seguir, os indivíduos foram mantidos com água e dieta artificial (hidrolisado de proteína de cana-de-açúcar, açúcar mascavo e água) *ad libidum*, e mantidos em condições controladas de temperatura (25±2°C), fotoperíodo (12:12 L:D) e umidade (60±5%), de acordo com metodologia descrita por Selivon (2005). Quando pertinente, algum substrato para oviposição, natural ou artificial, também foi ofertado. Detalhes da composição desse substrato são fornecidos nas seções subsequentes.

Figura 2 – Indivíduos adultos de *Anastrepha* sp.1 *affinis fraterculus*. Uma fêmea (a esquerda) e um macho (a direita).

III.2 Produção do dsRNA

III.2.1 Seleção e teste dos iniciadores

Os alvos para produção das moléculas de dsRNA utilizados foram as sequências de cDNA dos genes *transformer* (*tra*), *transformer-2* (*tra-2*) e *doublesex* (*dsx*) de *A. sp.1* aff. *fraterculus* disponíveis no banco de dados do GenBank® (EU024499.1, FN658608.1 e DQ494344.1, respectivamente). Utilizou-se a plataforma *online* Primer Blast® (NCBI) para seleção de iniciadores com 20-25 pb de comprimento e com temperatura de hibridização entre 52-57°C. Os iniciadores foram selecionados de modo a amplificar sequências de cDNA com comprimento de até ~400pb, o que corresponde a um tamanho suficiente para promover silenciamento gênico eficiente através da técnica de RNAi em *Anastrepha* (Sarno *et al.*, 2010; Teixeira, 2017; Vicari *et al*., 2021), e de modo a amplificar a região envolvendo os éxons comuns a ambos os sexos. Como os três genes analisados apresentam padrão de *splicing* sexo específico, isso garante que possíveis efeitos tanto em machos quanto em fêmeas sejam verificados.

Estes iniciadores foram utilizados para a produção das moléculas de AftradsRNA, Aftra-2dsRNA e AfdsxdsRNA, respectivamente. Além disso, como controle dos procedimentos, foi produzido dsRNA para o silenciamento de um gene que não é presente no genoma *Anastrepha.* Para isso, um fragmento do gene de resistência à ampicilina (Amp^R) do plasmídeo comercial pGEM-T Easy® (Promega), foi utilizado para produção de AmpRdsRNA. Por se tratar de um gene que é ausente no genoma de *Anastrepha*, espera-se que a aplicação de Amp^RdsRN não resulte em alterações das características analisadas. Assim, todos os processos descritos a seguir, desde a seleção e teste dos iniciadores, também foram realizados visando a produção de AmpRdsRNA, com as alterações pertinentes indicadas a cada etapa.

Após seleção dos iniciadores, eles foram testados quanto a sua eficácia na amplificação de fragmentos específicos. Para isso, performou-se a amplificação (por PCR) de fragmentos nucleotídicos a partir do DNA genômico (ou plasmidial, no caso do controle). Então, o processo começou com a extração do DNA genômico, seguindo protocolo estabelecido no laboratório (Sambrook *et al*., 1989). Neste, indivíduos adultos foram mantidos individualmente em microtubos (1,5 mL) e congelados em nitrogênio líquido por 10 segundos. Com o microtubo ainda mantido no nitrogênio, os indivíduos foram macerados. O material resultante foi mantido em gelo e adicionou-se 250 µL de solução tampão para extração de DNA de artrópodes [200 mM Tris-HCl (pH = 8,8), 60 mM NaCl, 10mM EDTA, 0.15 mM espermina, 0.15 mM espermidina], e misturou-se com auxílio do macerador. As amostras foram incubadas a 65ºC por 15 minutos para inativar as nucleases presentes e então adicionou-se 250 µL de solução tampão de extração com SDS [200 mM This-HCl (pH = 8,8), 30 mM EDTA, 2% SDS) e 5 µL de RNAse A (25 mg/mL) e as amostras foram novamente incubadas a 65ºC, por 10 minutos. Após esse período adicionou-se 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) e as misturas foram incubadas por mais 1 hora a 65ºC. Depois desse período, adicionou-se 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), as soluções foram agitadas em vórtex e então foram centrifugadas por 5 minutos a 15000 x g. O sobrenadante foi recuperado, adicionado em novo microtubo e o passo, a partir da adição da solução de fenol, foi repetido por uma vez. Para remover o fenol residual, 500 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (25:1) foram adicionados ao sobrenadante agitado em vórtex e posteriormente centrifugado por 5 minutos a 15000 x g. O sobrenadante foi recuperado e, para promover a precipitação do DNA, adicionou-se 50 µL de NaCl 5M e 1 mL de etanol 100%. A solução foi mantida por 1 hora a -20ºC e então foi centrifugada por 30 minutos a 15000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi lavado em etanol 70%, e novamente centrifugado, por 5 minutos a 15000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi seco à temperatura

ambiente por 5 a 10 minutos. Após esse período os precipitados de DNA foram ressuspenso em 50 µL de TE por 24 horas a 4ºC, então foram armazenados a -20ºC ou imediatamente utilizados nas etapas seguintes.

Após a extração do DNA genômico, seguiu-se com a amplificação (PCR). Cada reação de amplificação continha 1 ng de DNA genômico, 0,5 µM de cada iniciador, 0,2mM de dNTPs, 1x tampão de PCR (Cellco) e 0,05 U/µL Taq *High Fidelity* (Cellco). Após testes iniciais para determinar a melhor temperatura de hibridização possível para cada par de iniciadores, as amplificações foram propriamente efetuadas. As amplificações foram feitas em termociclador Veriti® Gradiente (Applied Biosystems) através do seguinte programa: 2 minutos a 95ºC, seguido de 35 ciclos compostos por (a) 15 segundos a 95ºC (desnaturação), (b) 15 segundos a 55ºC (hibridização) e (c) 2 minutos a 68ºC (extensão), seguidos de etapa final de extensão 10 minutos a 68ºC. Após a amplificação, os fragmentos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1% (72 V por 60 minutos), corado com GelRed® (Thermo) e utilizando *GeneRuler 1kb DNA Ladder* (Thermo) como marcador. O gel de eletroforese foi observado em transluminador UV (Vilber Lourmat), e foi fotografado utilizando digitalizadora acoplada. As imagens dos géis foram transferidas para computador para posterior análise.

III.2.2 Síntese dos dsRNA

A produção de dsRNA envolve duas etapas: 1) a síntese de cDNA a partir do RNA total e 2) a síntese de dsRNA a partir do cDNA. A síntese do cDNA foi feita a partir do RNA total extraído de fêmeas adultas. Para isso, 3-5 indivíduos foram mantidos em microtubos (1,5 mL) e macerados em nitrogênio líquido. Foi adicionado 1 mL de Trizol® (Sigma) e 10 µL de β-mercapto a cada amostra e a solução foi misturada por inversão e mantida à temperatura ambiente por 5 minutos. Estes microtubos então foram centrifugados (10 minutos a velocidade

máxima) e o sobrenadante transferido para novos microtubos onde foram adicionados 400µL de clorofórmio a cada amostra. A solução foi misturada em vórtex e mantida à temperatura ambiente até separação das fases (cerca de 3 minutos) e novamente centrifugada (5 minutos a velocidade máxima). Ao sobrenadante, foram adicionados 600µL de isopropanol 100% para precipitação do RNA. A amostra foi centrifugada (10 minutos a velocidade máxima) e lavada duas vezes em etanol 70%. Por fim, foi ressuspensa em 100 µL de água milli-Q e analisada em NanoDrop®, para quantificação da quantidade de RNA obtida e verificação da pureza das amostras, e armazenadas a -80°C.

Após essa etapa, as moléculas de cDNA foram produzidas utilizando o *kit* comercial SuperScript® III para RT-PCR (Thermo) a partir do RNA total (5 µg por reação) seguindo instruções do fabricante, sem alterações metodológicas. Após produção do cDNA, este foi armazenado a -20ºC ou imediatamente utilizados como moldes para reações de amplificação utilizando os iniciadores descritos em III.2.1, para verificar a eficácia da amplificação. As reações de PCR e a eletroforese foram feitas nas mesmas condições apresentadas no item III.2.1, com a diferença que o tempo de extensão durante os ciclos da PCR foi reduzido para 30 segundos. Os produtos de PCR então foram purificados com *kit* de purificação em coluna *GeneJet PCR Purification Kit* (Thermo), seguindo instruções do fabricante e armazenados a -20ºC.

Adicionalmente, para verificar se os fragmentos amplificados correspondem aos genes de interesse, as sequências dos cDNA dos genes em questão foram sequenciadas (Sanger). Para reação de sequenciamento foram utilizados os mesmos iniciadores descritos no item III.2.1 e *kit* comercial BigDye® Terminator v.3.1 (Applied Biosystems), seguindo as orientações do fabricante. A leitura das sequências foi feita em sequenciadores ABI PRISM® 3130XL Genetic Analyzer (Hitachi) no departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

Após essa etapa de verificação, o cDNA foi novamente amplificado com iniciadores correspondentes aos descritos no item III.2.1, porém contendo a sequência do promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATAG-3'), na sua posição 5' para posterior produção de dsRNA. Cerca de 1 µg de cDNA foi utilizado em reação de transcrição *in vitro* por 16 horas com RNA polimerase T7 utilizando *kit* comercial MegaScript T7® (Thermo), seguindo as instruções do fabricante sem alterações metodológicas. As moléculas de dsRNA produzidas foram purificadas através de precipitação em cloreto de lítio. Para isso, às reações de síntese, foi adicionado 30 µL de cloreto de lítio, as soluções foram mantidas a -20°C por durante 1 hora, centrifugadas (15 minutos a 15000 x g) e então lavadas em etanol 70%. Por fim o dsRNA precipitado foi ressuspenso em tampão de injeção [5mM KCl, 0,1 mM NaH_2PO_4 (pH 6,8)] para a concentração final de 2µg/µL, previamente testada como eficiente para promover o silenciamento gênico em *Anastrepha* através do procedimento de injeção abdominal (Vicari, 2016; Teixeira, 2017; Vicari *et al*., 2021). As concentrações e as purezas das amostras foram verificadas através de análise em NanoDrop®. Por fim, as amostras foram armazenadas a -80°C ou utilizadas imediatamente para promover o silenciamento gênico em *Anastrepha*.

III.2.3 Testes de expressão

Foram feitos testes de expressão para confirmar a capacidade dos dsRNA produzidos promoverem o silenciamento dos genes em questão, e para determinar por quanto tempo esse efeito permanece ativo nos adultos. Isso é fundamental pois as moléculas de dsRNA injetadas tendem a ser degradas e/ou consumidas após certo tempo. Assim, algumas alterações podem estar presentes apenas durante o intervalo de efeito do silenciamento e depois o fenótipo normal pode ser restaurado. Portanto, é fundamental determinar quanto tempo após a injeção de dsRNA o silenciamento gênico começa e por quanto tempo ele dura. Para isso

quatro grupos de 15 fêmeas adultas cada foram separados, e cada indivíduo foi injetado com 2µL de (a) dsRNA do gene a ser silenciado (AftradsDNA, Aftra2dsRNA ou AfdsxRNA) ou (b) ou AmpRdsRNA (controle). Como controle interno, 3 fêmeas de cada grupo tiveram seu RNA total extraído antes da injeção e foram feitas reações de amplificação (RT-PCR), seguindo a mesma metodologia descrita em III.2.2, exceto pela redução da quantidade de ciclos para 32. Após a injeção dos dsRNA, a cada 72 horas, 3 fêmeas de cada um dos tratamentos tiveram seu RNA total extraído para uso em RT-PCR a fim de verificar a eficácia dos dsRNA em promover o silenciamento dos genes em questão. Esse procedimento durou por 12 dias após a injeção inicial dos dsRNA. A análise das RT-PCR foi feita em gel de eletroforese, seguindo metodologia descrita em III.2.2, e se deu por comparação da intensidade das bandas ao longo do período analisado e em relação ao grupo controle. Antes de realizar os testes de expressão, foram feitos procedimentos de padronização das reações de RT-PCR.

III.3 Fecundidade e fertilidade

Para cada um dos tratamentos, 20 fêmeas virgens foram isoladas em gaiolas de criação até que atingissem a maturidade sexual (cerca de 15 dias após a emergência do adulto). A verificação de que atingiram a maturidade sexual se deu a partir do fornecimento de substratos artificiais para oviposição (hemisferas de ágar 3% coradas com anilina e envoltas por Parafilm®; Böller, 1968 modificado). Assim que as fêmeas de *Anastrepha* atingem a idade reprodutiva elas começam a colocar ovos, ainda que não fertilizados. Nesse momento, que ocorreu entre 12-15 dias após a emergência das imagos, essas fêmeas foram tratadas com os dsRNA dos genes de interesse.

Neste trabalho, quando mencionado que os indivíduos foram tratados com dsRNA, esse procedimento se refere à microinjeção de dsRNA dos genes de interesse. Para isso, em todos os casos, foi utilizado 1µL de solução de dsRNA

em solução tampão de injeção [5mM KCl, 0,1 mM NaH_2PO_4 (pH=6,8)] a 2µg/µL, para um total de 2 µg de dsRNA injetados por indivíduo. Neste procedimento, os indivíduos tratados foram anestesiados em gelo (-20°C durante 5 minutos) e então, seguindo protocolo descrito para *D. melanogaster* (Dzitoyeva *et al.*, 2001, modificado) uma agulha de vidro (Eppendorf) acoplada a uma mangueira de látex (Fig. 3) foi utilizada para injetar as soluções de dsRNA na pleura desses indivíduos, na região entre o terceiro e o quarto segmento abdominal (Fig. 3). O procedimento é realizado sob estereomicroscópio, para melhor visualização do local de injeção, e sobre placa de gelo, de forma a manter os indivíduos anestesiados durante todo processo, de acordo com metodologia previamente estabelecida no laboratório (Vicari *et al*., 2021).

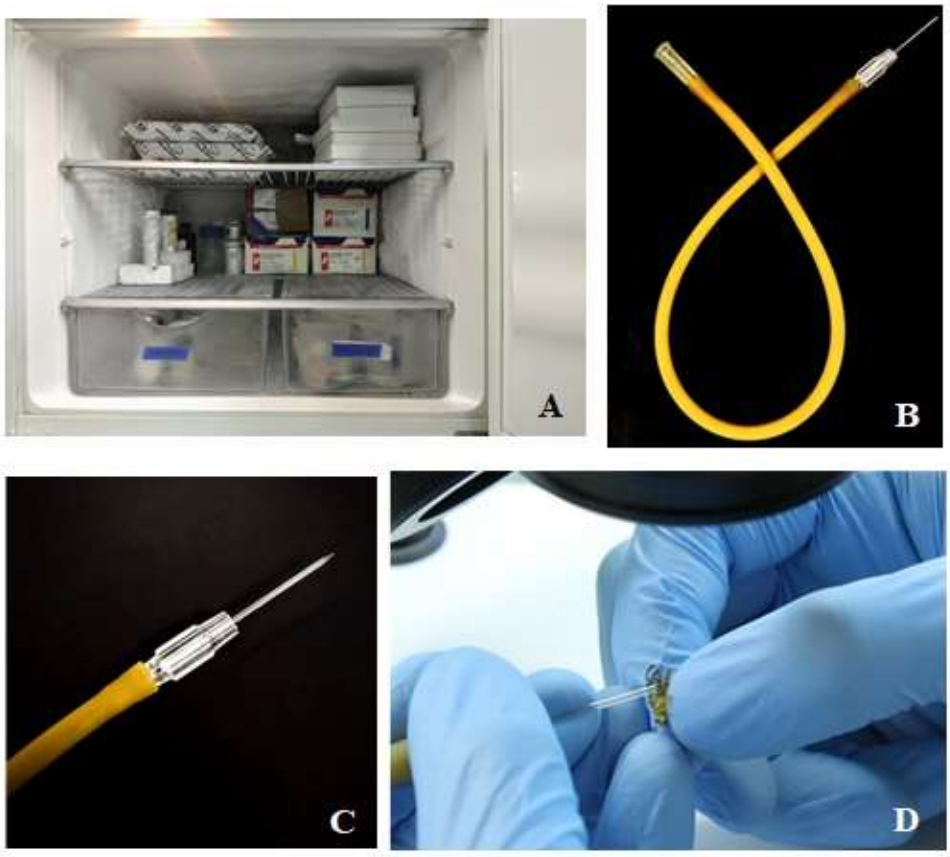


Figura 3 – Equipamentos e procedimentos utilizados na técnica de microinjeção abdominal. (A) Os indivíduos são colocados em f*reezer* para anestesia em gelo (-20ºC). (B) Agulha de vidro acoplada a mangueira de látex com (C) destaque para a extremidade da agulha. (D) Procedimento de microinjeção sendo realizado sob estereomicroscópio.

Após esse tratamento, as fêmeas virgens foram então colocadas individualmente em caixas de criação (12x13x14,5cm) junto de 3 machos virgens de mesma idade e oriundos da mesma população, com suprimento de água e comida *ad libidum*. A cada dois dias foi fornecido um substrato artificial de oviposição (hemisferas de ágar 3% coradas com anilina e envoltas por Parafilm®; Böller, 1968 modificado.; Fig. 4) e ovos foram recuperados. Os ovos foram contabilizados para determinar a fecundidade de cada fêmea durante o período de 10 dias, que corresponde ao período em que há efetivo silenciamento gênico a partir da injeção de dsRNA (Peng *et al.*, 2015; Teixeira, 2017 e determinado no item III.1.3). Os ovos removidos dos substratos com auxílio de estilete e pincel foram transferidos para uma placa de Petri contendo ágar 1% (Fig. 4). Essas placas foram mantidas em estufas a 25ºC por 5 dias, a fim de determinar a proporção de eclosão desses ovos e assim estimar a fertilidade.

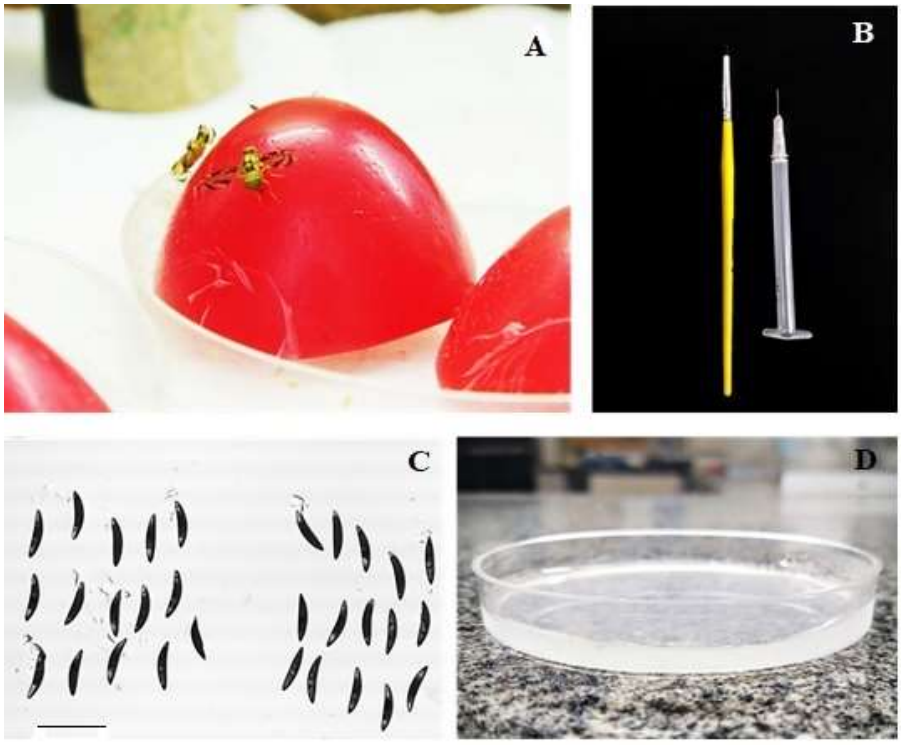


Figura 4 – Alguns materiais utilizados nos testes de fecundidade e fertilidade. (A) fêmea colocando ovos em substrato artificial de oviposição. (B) pincel e estilete utilizados para remoção dos ovos. (C) ovos em placa de Petri vistos em estereomicroscópio (barra = 1,5 mm). (D) placa de Petri com ágar 1%.

III.4 Tamanho dos Ovos

Os ovos alocados nas placas de Petri para cálculo da fertilidade descritos no item III.3 também foram utilizados para análise do tamanho destes ovos, desde que há relato na literatura que na mosca-das-frutas *Bactrocera dorsalis* ocorre diminuição da quantidade de vitelo presente nos ovos de fêmeas tratadas e isso se reflete na diminuição do tamanho desses ovos (Chen *et al.*, 2008). No presente estudo, os ovos foram observados em estereomicroscópio MZ 125 (Leica), fotografados com câmera IC A (Leica) e, utilizando o *software* Leica Application Suite (LAS, v.4.10.0), foram medidos em seu eixo longitudinal (Fig. 5), de modo a verificar a existência de diferenças quanto ao tamanho dos ovos produzidos pelas fêmeas de diferentes tratamentos. Como controle do procedimento, um lote de fêmeas foi tratado com AmpRdsRNA, conforme descrito no item III.2, e foi analisado da mesma forma.

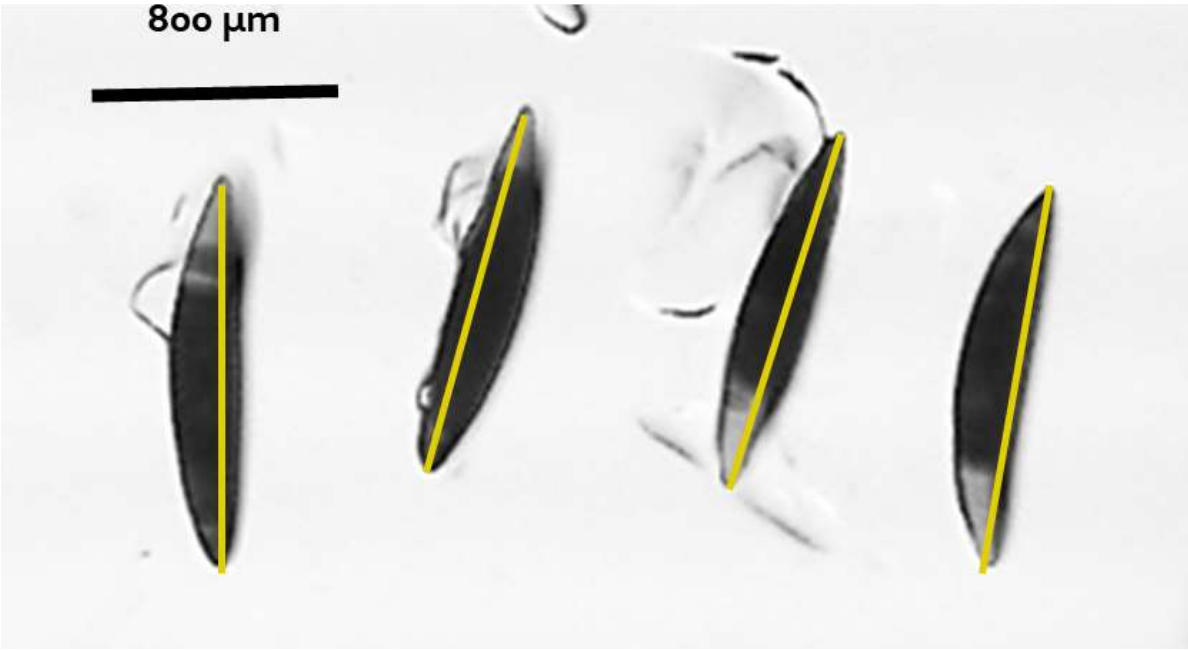


Figura 5 – Ovos de *Anastrepha* recuperados em placas de Petri e vistos em estereomicroscópio. As linhas amarelas mostram o eixo longitudinal dos ovos, nos quais as medidas foram tomadas.

III.5 Morfologia das gônadas

Para determinar se a expressão desses genes de determinação sexual influencia na morfologia das gônadas estas foram (a) analisadas quanto ao seu aspecto geral e (b) medidas, seguindo metodologia previamente descrita (Chen *et al*., 2008, modificado). Quando os adultos de *Anastrepha* emergem, suas gônadas encontram-se ainda no início do seu desenvolvimento. Sua maturação ocorre em um intervalo de aproximadamente 15 dias após a emergência, que coincide com a idade em que os adultos atingem a maturidade sexual. Como os genes de determinação sexual são expressos em todos os estágios do ciclo de vida de *Anastrepha* (Sarno *et al.*, 2010) é possível que eles atuem de algum modo mediando esse processo. Portanto, para análise dos efeitos desses genes no desenvolvimento dos ovários, grupos de 40 fêmeas recém-emergidas (no dia de sua emergência) foram tratados com cada solução de dsRNA e estas foram mantidas em gaiolas de criação até que atingissem a idade reprodutiva. Durante esse período, 6 indivíduos foram dissecados a cada 3 dias para análise dos seus ovários. Elas foram dissecadas em solução Ringer de inseto, tiveram seus ovários removidos e analisados para análise de seu aspecto geral (cor, forma e presença de estruturas esperadas). Suas gônadas também foram fotografadas e posteriormente medidas em seu eixo longitudinal, utilizando os mesmos equipamentos e metodologia de medida descrita anteriormente (item III.4), a fim de determinar se existe diferença no desenvolvimento dos ovários nos diferentes tratamentos. Por questão de padronização, apenas a gônada esquerda de cada indivíduo foi considerada.

Para determinar a influência da expressão no desenvolvimento dos testículos, o mesmo procedimento foi feito com machos, nas mesmas condições descritas para as fêmeas. Adicionalmente, após a tomada das dimensões dos testículos estes foram esmagados em lâminas contendo solução Ringer de inseto e analisados em microscopia de fase, para verificar a presença de espermatozoides

móveis, seguindo metodologia previamente descrita (Vicari *et al*. 2021), como um indicativo da fertilidade desses machos. Como controle destes procedimentos um lote de fêmeas e um lote de machos, respectivamente, foram tratados com AmpRdsRNA, conforme descrito no item III.2., e foram submetidos aos mesmos procedimentos aqui descritos.

III.6 Comportamento reprodutivo

Uma vez que existe a hipótese de que os genes da determinação sexual atuem também no comportamento de *Anastrepha*, inclusive em comportamentos reprodutivos (Teixeira, 2016), como ocorre em outros insetos (McRobert & Tompkins, 1985; Wateburry *et al*., 1999; Rideout *et al*., 2010; Chen *et al*., 2008; Passra *et al*., 2014), foram observados os comportamentos reprodutivos de indivíduos adultos recém-emergidos tratados com dsRNA desses genes, seguindo protocolo previamente estabelecido (Segura *et al*., 2007, modificado). No caso das fêmeas, para cada gene a ser testado, 20 fêmeas recém-emergidas foram tratadas com dsRNA e isoladas até que atingissem a idade reprodutiva. Neste momento, elas foram novamente tratadas com dsRNA, pois após esse período espera-se que o efeito do silenciamento já estivesse cessando (item III.2.3). Depois de 24 horas deste reforço de dsRNA, as fêmeas foram alocadas em caixas de criação (12x13x14,5cm) contendo um ramo de goiabeira (*Psidium guajava*) e 2 ou 3 goiabas (substratos naturais para oviposição), além de comida e água *ad libidum* (Fig. 6). Uma hora após a liberação das fêmeas nestas gaiolas, 20 machos de mesma idade foram colocados na mesma gaiola. No momento em que os machos foram colocados na gaiola, a frequência de fêmeas performando diferentes comportamentos sexuais foi observada e registrada, em intervalos de 15 minutos. As observações foram realizadas entre 7h30 e 12h00, horário que corresponde ao período de atividade sexual dessa espécie (Vera *et al*., 2004). As atividades registradas, segundo as atividades descritas para *Anastrepha* (Cendra

et al., 2011, modificado; Fig. 7) foram: (a) interação com os machos, (b) cópula, (c) procura de sítio para oviposição, (d) punctura da oviposição, (e) arrasto (marcação do fruto com feromônios), (f) outras atividades (como movimentação, alimentação, hidratação etc.) e (g) descanso.

No caso dos machos, o mesmo procedimento foi realizado, mas os machos foram adicionados primeiro nas gaiolas de criação e só depois fêmeas virgens não tratadas foram adicionadas. Neste caso, os comportamentos analisados foram: (a) vibração das asas, (b) emissão de feromônios (inchaço das glândulas abdominais), (c) interação com a fêmea, (d) cópula, (e) outras atividades (como movimentação, alimentação, hidratação etc.) e (f) descanso. Como controle dos procedimentos um lote de fêmeas e um lote de machos, respectivamente, foram tratados com AmpRdsRNA, conforme descrito no item III.2, e foram submetidos aos mesmos procedimentos.

Figura 6 – Exemplo de caixa de criação utilizada nos testes de comportamento. As goiabas foram retiradas da caixa para obtenção desta imagem.

Figura 7 – Alguns dos comportamentos sexuais observados no trabalho. (A) macho (à direita) com as glândulas abdominais inchadas durante emissão de feromônios na frente de uma fêmea. É comum que, nesse momento, ocorram interações entre machos e fêmeas, que envolvem deslocamentos laterais, aproximação e agitação das cabeças e outros movimentos característicos. (B) macho vibrando as asas, acredita-se que seja nessa etapa que ocorra o chamamento da fêmea até o macho. (C) momento da cópula no qual o macho sobe sobre a fêmea e encaixa seu edeago na abertura da bainha do ovipositor. A primeira imagem foi cedida pela Dra. Paula Perre.

III.7 Efeito Materno

Existe a possibilidade de que os genes de determinação sexual tenham efeito materno, ou seja, que a expressão dos genes nas mães influencie na expressão nos embriões (Ruiz *et al.*, 2007b; Sarno *et al.*, 2010). Recentemente, esse efeito materno foi demonstrado para o gene *tra-2* (Vicari *et al.*, 2021), sendo que um dos efeitos do silenciamento gênico nas fêmeas parentais foi o desenvolvimento de fêmeas genotípicas com o fenótipo masculino na progênie, os chamados de pseudomachos (XX) (Sarno *et al*., 2010; Vicari 2016). Por conta dessa alteração do fenótipo sexual, a progênie de fêmeas tratadas com tra-2dsRNA apresenta um desvio da proporção sexual a favor dos machos. Essa compreende uma característica facilmente observável.

Para verificar se efeitos semelhantes também são obtidos a partir do silenciamento gênico parental de *tra* e *dsx*, o que sugeriria efeito materno destes genes, e para comparar eventuais efeitos verificados, grupos de 15 fêmeas virgens maduras foram tratadas com 2 µg de dsRNA dos três diferentes genes (e 10 para o tratamento controle). Transcorridas 24 horas do tratamento com dsRNA, elas foram colocadas em caixas de criação (12x13x14,5cm) com a mesma quantidade de machos de mesma idade. Foram fornecidos frutos de mamoeiro (*Carica papaya*) como substratos naturais para oviposição, além de comida e água *ad libidum*. Os frutos foram removidos após período de 5 dias, e um novo fruto foi fornecido em cada gaiola por mais 5 dias. Esse segundo período, de 5-10 dias após o tratamento com dsRNA, corresponde ao período em que há o máximo efeito do silenciamento gênico (item III.2.3). Após a remoção desses frutos das gaiolas de criação, eles foram alocados em caixa contendo vermiculita para que larvas pudessem seguir seu desenvolvimento. Após atingirem o estágio de pupa, elas foram separadas e alocadas novamente em gaiolas de criação até a emergência dos adultos, que foram contabilizados quanto à proporção sexual. Além desse registro, todos os indivíduos da progênie também foram dissecados

em Ringer de insetos e tiveram a região da genitália, interna e externa, analisada sob estereomicroscópio, de modo a verificar a presença de anomalias ou alterações no desenvolvimento dessas estruturas.

III.8 Análises estatísticas

Sempre que necessário, os dados coletados a partir dos procedimentos descritos a seguir foram submetidos a testes estatísticos. Análises baseadas na comparação de grandezas foram submetidas a testes paramétricos (ANOVA) ou não-paramétricos (Mann-Whitney), dependendo da normalidade da distribuição. Nas análises cujos dados representam proporções foram realizados testes qui-quadrado (χ^2). Todos esses testes foram desenvolvidos através do *software* Statistica10 (StatSoft Inc®), seguindo orientações de parâmetros fornecidos pelo desenvolvedor, e considerando nível de significância $\alpha = 0,05$.

IV - Resultados

IV. 1 Produção e teste do dsRNA

IV.1.1 Seleção e teste dos iniciadores

A seleção dos sítios-alvo dos genes *tra* e *dsx* foi feita a partir de sequências de cDNA de *Anastrepha* sp.1 aff. *fraterculus* publicadas no GenBank® (EU024499.1 e DQ494344.1, respectivamente). Utilizou-se a ferramenta *online* do NCBI Primer Blast para seleção de iniciadores (Tab. 1) cuja utilização em PCR a partir de cDNA resulta na amplificação de fragmentos de ~320 pb e ~170 pb, respectivamente. O par de iniciadores utilizados para amplificação do gene *tra*-2 foi retirado da literatura (Sarno *et al.*, 2010) e gera sequência de ~280 pb. Tamanhos entre 150 e 350 pb são adequados para promover um silenciamento gênico eficiente em espécies de *Anastrepha* (Teixeira, 2017; Vicari *et al*., 2021).

Além disso, também foi utilizado um par de iniciadores utilizado para amplificação de um fragmento de ~550 pb contendo o gene Amp^R a partir do plasmídeo comercial pGEM-T Easy® (Promega) para produção de AmpRdsRNA, que foi utilizado como controle dos experimentos. Como esse se trata de um gene ausente no genoma de *Anastrepha*, não são esperadas alterações nas características analisadas a partir deste tratamento. No caso dos genes de determinação sexual, que apresentam *splicing* sexo-específico, foram selecionados fragmentos correspondentes às regiões comuns a ambos os sexos (*Ruíz* 2005, 2007a, 2007b; Sarno *et al*., 2010), de modo a garantir que o silenciamento gênico seja feito tanto em machos quanto em fêmeas. No caso do gene *tra* e *tra-2*, os iniciadores se localizam nos éxons 1 e 3, e no caso do gene *dsx*, nos éxons 1 e 2 (Fig. 8).

Tabela 1 – Sequências de iniciadores utilizados no estudo.

Iniciador	**Sequência (5-3')**
traF	CTATAGAGCGCAGTGTCGAT
traR	TTTAATGGCTTGGTTCGTGG
tra2F	ATGAGTCCACGTAC
tra2R	CACGTCGCTTATCGTACGGA
dsxF	ACTCCATCCCAACGGTGTCA
dsxR	CTCCTCGATGCGTCTTGAAGC
Amp^{R}F	GCCTCCATCCAGTCTATTAAT
Amp^{R}R	CAGAAACGCTGGTGAAAGTA

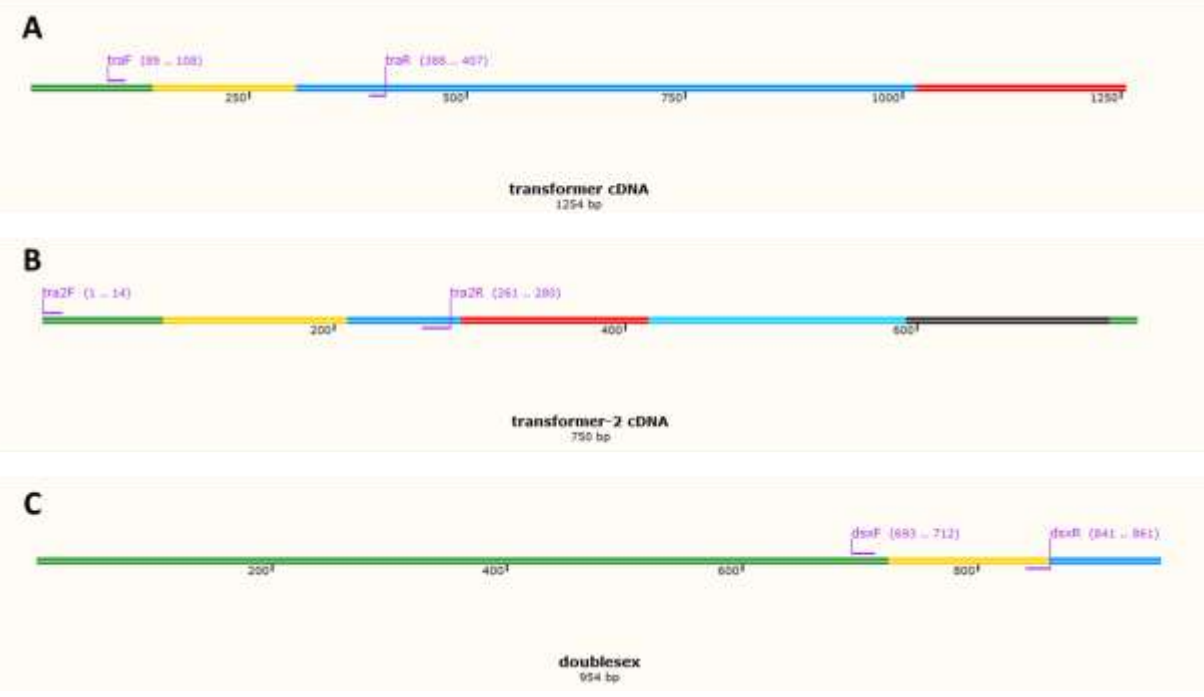


Figura 8 – Localização dos iniciadores utilizados no cDNA dos genes de determinação sexual de fêmeas de *Anastrepha*. Cores diferentes indicam diferentes éxons. A) Localizações dos iniciadores no gene *trasnformer;* B) *transformer-2* e C) *doublesex*. Imagens feitas com o *software* SnapGene® Viewer (v. 3.0.3).

Para testar se os iniciadores eram capazes de amplificar os fragmentos de forma específica estes foram utilizados para amplificar (via PCR) as sequências genômicas a partir do DNA total de *Anastrepha* sp.1 aff. *fraterculus*. Em todos os casos o resultado foi positivo (Fig. 9).

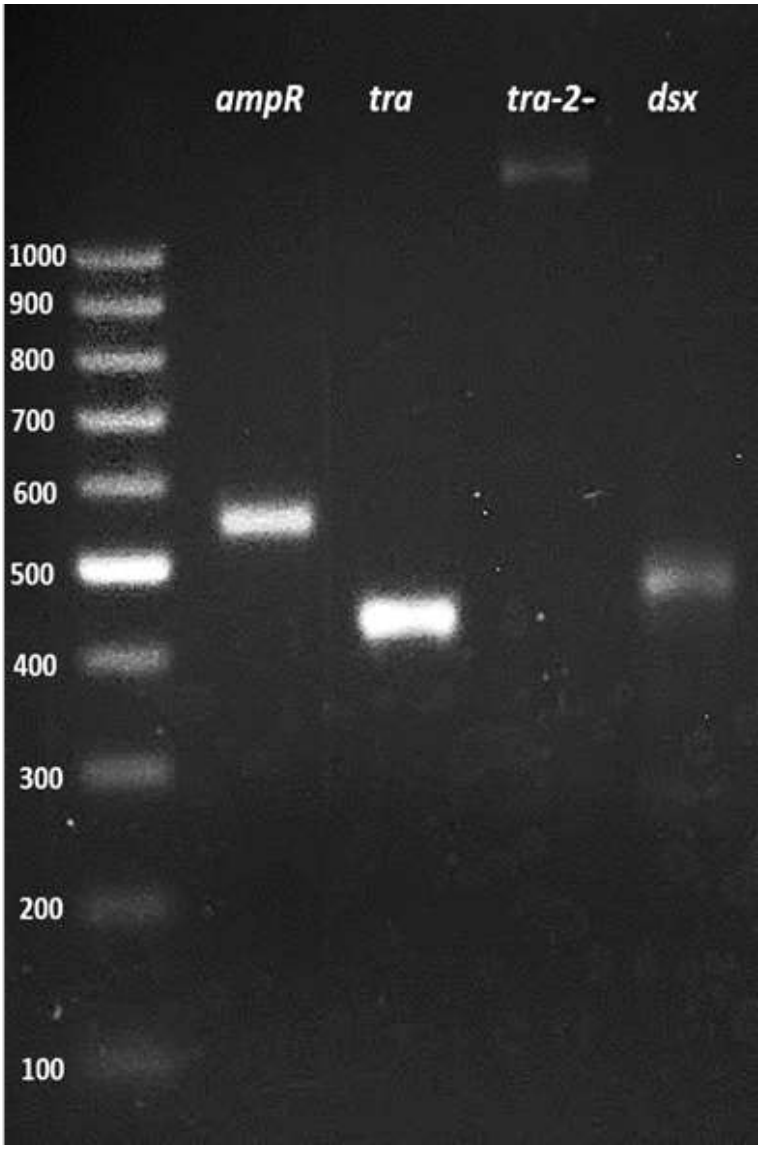


Figura 9 – Amplificação via PCR dos genes *tra*, *tra-2* e *dsx* a partir do DNA genômico extraído de fêmeas adultas de *Anastrepha*. A figura também mostra a amplificação do gene Amp^R, a partir do plasmídeo comercial pGEM-T Easy® (Promega), que será utilizado como dsRNA controle nos experimentos. A esquerda está o marcador GeneRuler™ 100pb DNA Ladder (Thermo), com os tamanhos das bandas indicados em pb.

No caso do gene *tra*, a amplificação gerou fragmento de ~450 pb a partir do DNA genômico. Esse corresponde ao valor esperado, uma vez que também ocorre a amplificação de alguns éxons macho-específicos e íntrons (Ruíz *et al.*, 2007b). Entretanto, no caso dos genes *tra-2* e *dsx* não existiam tamanhos esperados para a amplificação genômica, uma vez que a sequência e o tamanho dos íntrons amplificados não são conhecidos (Ruíz *et al.*, 2005, 2007a; Sarno *et al.*, 2010). No caso do gene Amp^R, amplificado a partir do plasmídeo comercial pGEM-T Easy® (Promega) o tamanho do fragmento obtido também esteve de acordo com o esperado (~550 pb). No caso de *tra-2* a amplificação, ainda que mais fraca que as demais, gerou um fragmento de >1 kb, indicando a presença de grandes íntrons desse gene. No caso de *dsx*, a amplificação gerou um fragmento de ~450 pb, indicando a presença de um íntron entre os éxons 1 e 2 (comum a ambos os sexos) de ~300 pb. É possível que a amplificação do *tra-2* tenha sido menos intensa que as dos demais alvos justamente devido ao maior comprimento do fragmento.

IV.1.2 Síntese dos dsRNA

Para síntese dos dsRNA de interesse, amostras de RNA total de indivíduos adultos de *Anastrepha* sp.1 aff. *fraterculus* foram extraídas. Utilizou-se o método de extração com Trizol®, seguindo protocolo estabelecido no laboratório. O RNA foi extraído a partir de *pools* de 5 de moscas fêmeas adultas da colônia citada, seguindo a metodologia descrita sem modificações. Foram obtidas amostras de RNA em alta concentração e com alta pureza (4500 ng/µL, 260/280: 2,11, 260/230: 2,23).

5 µg do RNA total foram utilizados como molde para a síntese do cDNA dos genes em questão, com uso do *kit* comercial SuperScript III® para RT-PCR (Thermo), seguindo recomendação do fabricante. A reação de RT-PCR se deu

para confirmar a natureza desses fragmentos. Ela seguiu metodologia descrita e os mesmos pares de iniciadores descritos no item IV.1.1, com a diferença de possuírem a sequência do promotor T7 a 5' (TAATACGACTCACTATAGG), necessária para as etapas subsequentes da síntese do dsRNA. Foi possível amplificar os fragmentos esperados de modo eficiente, perceptível pelo tamanho da banda no gel da eletroforese (Fig. 10).

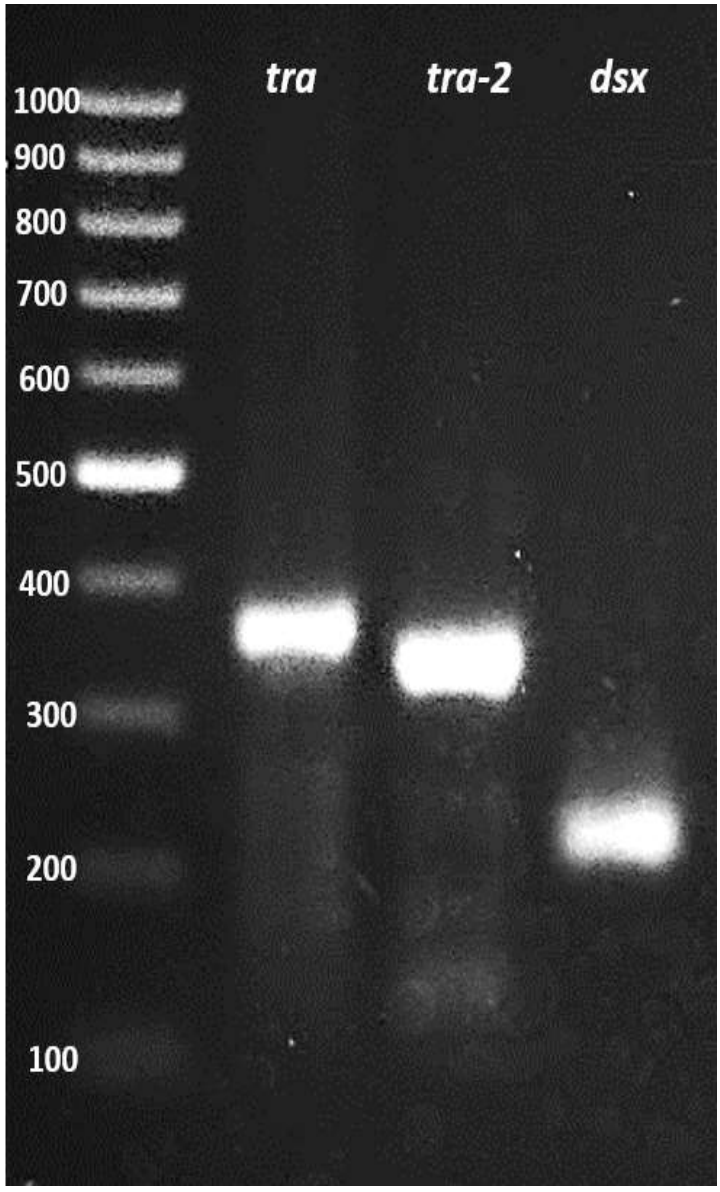


Figura 10 – Amplificação via RT-PCR dos genes *tra*, *tra-2* e *dsx* a partir do RNA total extraído de fêmeas adultas de *Anastrepha*. A esquerda está o marcador GeneRuler^{TM} 100pb DNA Ladder (Thermo), com os tamanhos das bandas indicados em pb.

Para confirmar a identidade dos fragmentos amplificados eles foram sequenciados. O sequenciamento Sanger foi feito no Instituto de Química da USP, seguindo protocolos e condições padronizadas. As sequências de cDNA obtidas foram comparadas sequências disponíveis no banco de dados do GenBank® através da ferramenta *online* Blast. A identidade com os fragmentos esperados foi superior a 98%, confirmando que os fragmentos de cDNA produzidos correspondem aos sítios selecionados (Fig. 11 a 13).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
558 bits(302)	8e-155	312/319(98%)	0/319(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    CTATAGAGCGCAGTGTCGATGCAAGTGAAGTGGTTATTAAACGTAGATTTGGTGAAGGTT  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  89   CTATAGAGCGCAGTGTCGATGCAAGTGAAGTGGTTATTAAACGTAGATTTGGTGAAGGTT  148

Query  61   CGAAACCTTTATTTCAACGTGATGACATTGTTGTGAACCCSAATARCGTTATTAAGGCTG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||| |||||||||||||
Sbjct  149  CGAAACCTTTATTTCAACGTGATGACATTGTTGTGAACCCCAATAGCGTTATTAAGGCTG  208

Query  121  CGGACTCCCATACAGAAAAACAWCTTATAAGTGAAAGTAAAAACAGGGCTAAGGACGTTT  180
            |||||||||||||||||||||| ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  209  CGGACTCCCATACAGAAAAACACCTTTTAAGTGAAAGTAAAAACAGGGCTAAGGACGTTT  268

Query  181  CAAATCAATATCTAAAAGGAAGTCGCAGTTCGWCWGATTCTAGCAGTCCAGAAGGATATC  240
            |||||||||||||||||||||||||||||||||| | |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  269  CAAATCAATATCTAAAAGGAAGTCGCAGTTCGACAGATTCTAGCAGTCCAGAAGGATATC  328

Query  241  GGAAGTACCATACCGGTCCCTATAATGACTGCACAACTAGTACCAATAATAGATCGCCTC  300
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||
Sbjct  329  GGAAGTACCATACCGGTCCCTATAATGACTGCACAACTAGTATCAATAATAGATCGCCTC  388

Query  301  CACGAACCAAGCCATTAAA  319
            |||||||||||||||||||
Sbjct  389  CACGAACCAAGCCATTAAA  407
```

Figura 11 – Alinhamento entre o fragmento sequenciado a partir da amplificação do cDNA de *transformer* de *A.* sp. 1 aff. *fraterculus* e a sequência utilizada para seleção do alvo (EU024499.1).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
510 bits(276)	2e-140	278/280(99%)	0/280(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    ATGAGTCCACGTACCCGTAGTCGTAGCATTTCCCCGCGTCGAAGTTATAGCAAATCGCCC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    ATGAGTCCACGTACCCGTAGTCGTAGCATTTCCCCGCGTCGAAGTTATAGCAAATCGCCC  60

Query  61   GCGCGGCGTAGCAATGGACGTCGCCGGCATTCTAGAGAAAARGTGTATAACTCTCGAAGC  120
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||
Sbjct  61   GCGCGGCGTAGCAATGGACGTCGCCGGCATTCTAGAGAAAAAGTGTATAACTCTCGAAGC  120

Query  121  CGTTCAGCCTCACGACACCCTCCTTCACCACCACCGCTACCAGCTGGACGTGCCGGCCRT  180
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  121  CGTTCAGCCTCACGACACCCTCCTTCACCACCACCGCTACCAGCTGGACGTGCCGGCCGT  180

Query  181  TACTCGGATGCCAGTAAAAGTTCTTCAACGTCACTCTCCCCACGTCATGGCCGCCGCGTT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  TACTCGGATGCCAGTAAAAGTTCTTCAACGTCACTCTCCCCACGTCATGGCCGCCGCGTT  240

Query  241  TCCCGTTCGCGTACACGCAGTCCGTACGATAAGCGACGTG  280
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  TCCCGTTCGCGTACACGCAGTCCGTACGATAAGCGACGTG  280
```

Figura 12 – Alinhamento entre o fragmento sequenciado a partir da amplificação do cDNA de *transformer-2* de *A.* sp. 1 aff. *fraterculus* e a sequência utilizada para seleção do alvo (FN658608.1, Sarno *et al.*, 2010).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
313 bits(169)	3e-81	169/169(100%)	0/169(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    ACTCCATCCCAACGGTGTCAATATTCCTTTAGCGCAGGATGTGTTTTTAGAGCATTGCCA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  693  ACTCCATCCCAACGGTGTCAATATTCCTTTAGCGCAGGATGTGTTTTTAGAGCATTGCCA  752

Query  61   AAAGCTGCTGGAGAAATTTCGTTATCCCTGGGAGATGATGCCGCTTATGTATGTGATATT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  753  AAAGCTGCTGGAGAAATTTCGTTATCCCTGGGAGATGATGCCGCTTATGTATGTGATATT  812

Query  121  AAAAGACGCTGGGGCAGACATTGAAGAGGCTTCAAGACGCATCGAGGAG  169
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  813  AAAAGACGCTGGGGCAGACATTGAAGAGGCTTCAAGACGCATCGAGGAG  861
```

Figura 13 – Alinhamento entre o fragmento sequenciado a partir da amplificação do cDNA de *doublesex* de *A.* sp. 1 aff. *fraterculus* e a sequência utilizada para seleção do alvo (DQ494344.1).

Após essa confirmação, os fragmentos produzidos a partir das reações de RT-PCR, utilizando os iniciadores com a sequência do promotor viral T7 foram utilizados como moldes para síntese dos dsRNA. Os fragmentos de dsRNA foram produzidos a partir de reações *in vitro* por 16 horas utilizando o *kit* comercial MEGA-Script T7® (Thermo) seguindo recomendações do fabricante.

IV.1.3 Testes de expressão

Para testar a eficiência dos dsRNA produzidos em promover o silenciamento dos genes analisados, foram feitos testes de expressão em indivíduos adultos injetados com 2 µg de (a) dsRNA do gene a ser silenciado ou (b) dsRNA controle. Os testes foram feitos através de RT-PCR, e a análise se deu através da comparação da intensidade das bandas obtidas no gel de eletroforese. Logo após a injeção do dsRNA e a cada 72 horas, três fêmeas de cada um dos tratamentos tiveram seu RNA total extraído para as reações de amplificação. Esse procedimento durou por 12 dias após a injeção do dsRNA. Antes de realizar os testes de expressão foram feitos procedimentos de padronização da RT-PCR.

Os resultados mostraram que todos os dsRNA produzidos foram eficientes em promover o silenciamento do gene alvo (Fig. 14). A redução foi verificada imediatamente após o tratamento com dsRNA e foi sendo mais intensa ao longo do período de análise. No caso do silenciamento do gene *tra*-2 houve uma fraca expressão a partir do 9º dia após tratamento com dsRNA, mas, mesmo nesse caso, não se compara a expressão verificada no tratamento controle. Considerando o conjunto dos genes analisados, o período correspondente a 6-12 dias após tratamento com dsRNA foi o período de maior redução no silenciamento gênico.

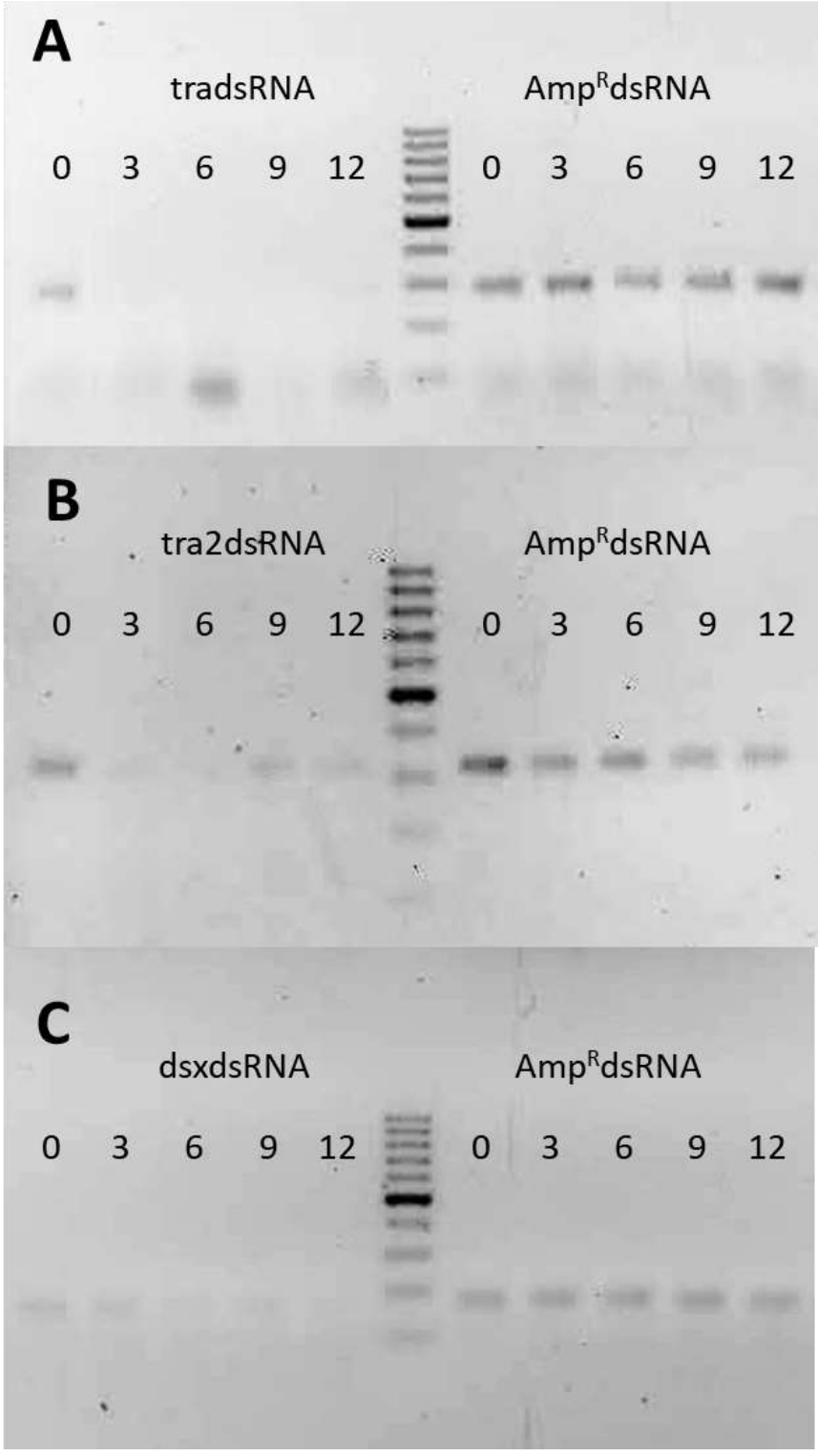


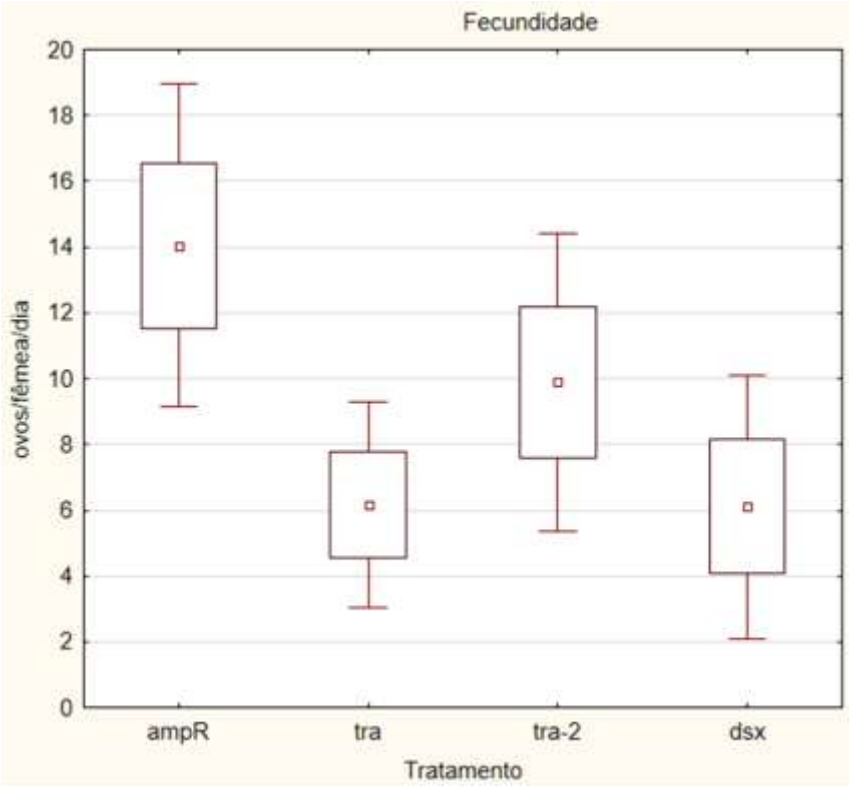
Figura 14 – Testes de expressão via RT-PCR dos genes (A) *tra*, (B) *tra-2* e (C) *dsx*, de indivíduos tratados com o dsRNA correspondente (esquerda) ou com dsRNA controle (direita). Os números indicam os dias após o tratamento com dsRNA. Ao meio está o marcador GeneRuler™ 100pb DNA Ladder (Thermo), com os tamanhos das bandas indicados em pb.

IV.2 Fecundidade e fertilidade

20 fêmeas maduras foram tratadas com dsRNA de cada um dos genes. Foram fornecidos substratos artificiais de oviposição para coleta dos ovos. As coletas ocorreram a cada 48 horas, em um período que durou de 3 a 11 dias após o tratamento com dsRNA (período 8 dias de análise). A fecundidade foi estimada a partir do número de ovos obtidos ao longo do período em cada tratamento. Os ovos foram transferidos para placas de Petri contendo ágar 1% e foram mantidos em estufa a 25ºC, a fim de determinar a quantidade de ovos que eclodiam, como forma de estimar a fertilidade das fêmeas em cada um dos tratamentos. Os valores de fecundidade e fertilidade obtidos foram testados quanto à normalidade dos dados, através de parâmetros descritivos (Fig. 15). Então, os valores obtidos nos diferentes grupos foram comparados através do teste de Mann-Whitney.

Os valores de fecundidade revelaram diferença significativa em relação ao controle (Tab. 2) no caso dos tratamentos com AftradsRNA (U=109,5, p=0,014), AfdsxRNA (U=102, p=0,008), mas não para o tratamento com Aftra2dsRNA (U=146,5, p=0,151). A análise dos dados de fertilidade revela resultados semelhantes: existe diferença significativa considerando as amostras tratadas com AfdsxdsRNA (U=87, p=0,002) e com AftradsRNA (U=87, p=0,001), mas não com Aftra2dsRNA (U=136, p=0,084)

Como forma de aprofundar a análise da redução na fertilidade das fêmeas, as proporções de eclosão, dada pelas proporções dos ovos eclodidos dos tratamentos com AftradsRNA e com AfdsxdsRNA, também foram comparadas com o controle através de teste χ^2 em tabela de contingência 2x2. Os resultados mostram que, apesar da redução na fertilidade global das fêmeas, o tratamento com AftradsRNA não resulta em diminuição da proporção de larvas eclodidas. Já o tratamento com AfdsxRNA resulta em significativa redução da proporção de eclosão (Tab. 3).



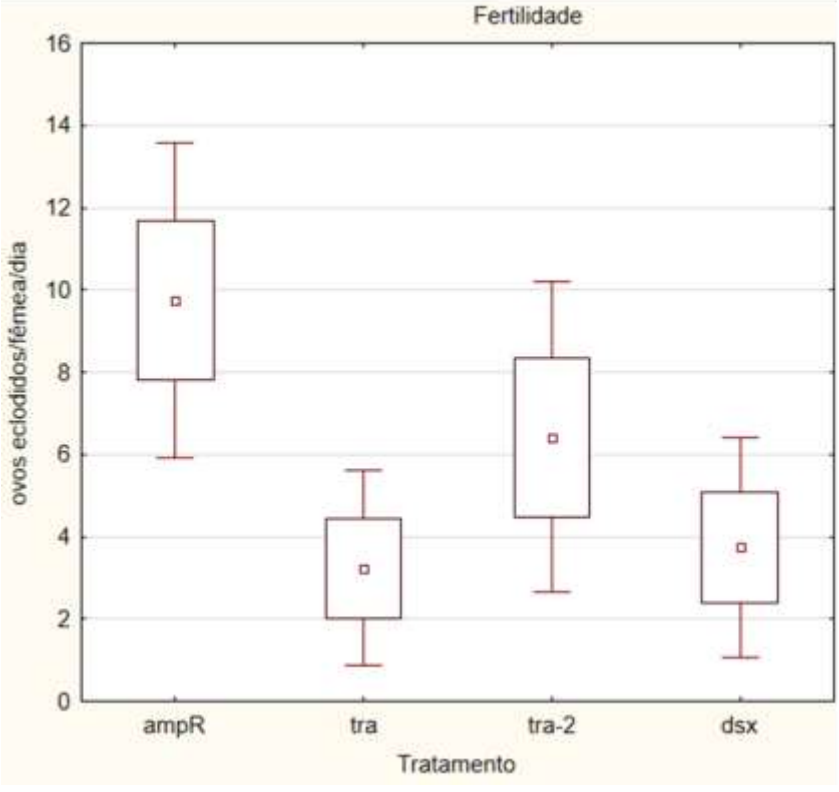


Figura 15 – Fecundidade (ovos/fêmea/dia) e fertilidade (ovos eclodidos/fêmea/dia) média em cada um dos tratamentos. Os valores indicados no *box-plot* correspondem a média, erro padrão e 1,96*erro padrão.

Tabela 2 – Fecundidade (ovos/fêmea/dia) e fertilidade (ovos eclodidos/fêmea/dia) média em cada um dos tratamentos. P valor obtido através teste de Mann-Whitney.

	Fecundidade		**Fertilidade**	
Tratamento	*Média (dp)*	*p*	*Média (dp)*	*p*
AmpR	14,1 (11,2)	NA	9,8 (8,72)	NA
tra	6,2 (7,2)	0,014*	3,2 (5,4)	0,002*
tra2	9,9 (10,3)	0,151	6,4 (8,6)	0,084
dsx	6,1 (9,14)	0,008*	3,7 (6,1)	0,001*

Tabela 3 – Comparação das proporções de eclosão dos tratamentos com AftradsRNA e AfdsxRNA com o tratamento controle (AmpRdsRNA). P valor obtido através de teste χ^2 com correção de Yates. NA = não se aplica.

Tratamento	**Total de ovos**	**Ovos eclodidos**	**Ovos não eclodidos**	**p**
Dsx	611	374 (61,2%)	237 (38,8%)	0,0000
Tra	613	450 (73,4%)	163 (26,6%)	0,4548
AmpR	1298	930 (71,6%)	368 (28,4%)	NA

IV.3 Tamanhos dos ovos

Os ovos coletados no item IV.2 foram medidos para verificar se há redução no tamanho dos ovos colocados pelas fêmeas tratadas com dsRNA. Em *Bactrocera dorsalis* ocorre redução dos ovos tratados com dsRNA de Bd-*dsx*dsRNA, relacionada com a redução na produção de vitelo e diminuição da expressão do gene *yolk* (Chen et al., 2007). Para esse teste, amostras de 27 a 60 ovos, de diferentes fêmeas foram medidas checadas quanto à normalidade dos dados, utilizando-se padrões descritivos. Então os tamanhos foram comparados

entre as diferentes amostras através de teste ANOVA seguido por teste de Dunnet (<CG), tanto considerando cada coleta separadamente quanto o período total da análise (11 dias após a injeção). Os resultados do teste estatístico (Tab. 4) e as medidas dos ovos (Fig. 16), expressas em µm, podem ser encontradas abaixo. Todos os genes analisados provocaram a diminuição no tamanho dos ovos produzidos pelas fêmeas tratadas, sendo que a maior redução foi verificada no grupo com expressão de *dsx* e *tra-2* silenciada. Posteriormente, foi feito o teste de Tukey, que não possui assunções *a priori* e permite a comparação de todas as amostras entre si, não apenas em relação ao controle (Tab. 5). Esse confirma que o tratamento com AfdsxdsRNA resultou em uma maior redução do tamanho dos ovos que os demais.

Tabela 4 – Tamanhos dos ovos de fêmeas tratadas. Valores representam a média e desvio padrão (dp) expressos em µm, nos diferentes dias de coleta dos diferentes tratamentos (Trat.) e considerando o total de ovos coletadas em cada tratamento. Os p valores (p) correspondem aos valores obtidos a partir do teste de Dunnet, assumindo hipótese de redução de tamanho em relação ao grupo controle.

	Dia 3		**Dia 5**		**Dia 7**		**Dia 9**		**Dia 11**		**Total**	
Trat.	*Média (dp)*	*p*	*Média (dp)*	*p*	*Média (dp)*	*p*	*Média (dp)*	*p*	*Média (dp)*	*p*	*Média (dp)*	*p*
AmpR	1322,4 (33,6)	NA	1300,7 (54,7)	NA	1294,9 (40,4)	NA	1291,2 (40,8)	NA	1288,3 (35,9)	NA	1298,9 (43,6)	NA
tra	1288,4 (69,6)	0,223	1338,4 (40,1)	0,999	1275,7 (49,2)	0,073	1258,9 (68,2)	0,007 *	1261,1 (38,7)	0,027 *	1284,5 (61,9)	0,030 *
tra-2	1326,9 (58,2)	0,841	1292,4 (60,7)	0,353	1237,4 (64,5)	0,000 **	1258,7 (57,3)	0,000 **	1261,8 (59,7)	0,019 *	1273,3 (66,5)	0,000 **
dsx	1261,3 (82,7)	0,000 **	1241,0 (41,1)	0,000 **	1188,5 (46,7)	0,000 **	1169,1 (43,2)	0,000 **	1174,0 (60,4)	0,000 **	1204,1 (66,2)	0,000 **

Tabela 5 – Resultados do teste de Tukey (p valor) entre o tamanho dos ovos coletados ao longo de todo experimento dos diferentes tratamentos.

	dsx	***tra***	***tra-2***	***AmpR***
dsx		0,000008*	0,000008*	0,000008*
tra	0,000008*		0,155380	0,107204
tra-2	0,000008*	0,155380		0,000010*
AmpR	0,000008*	0,107204	0,000010*	

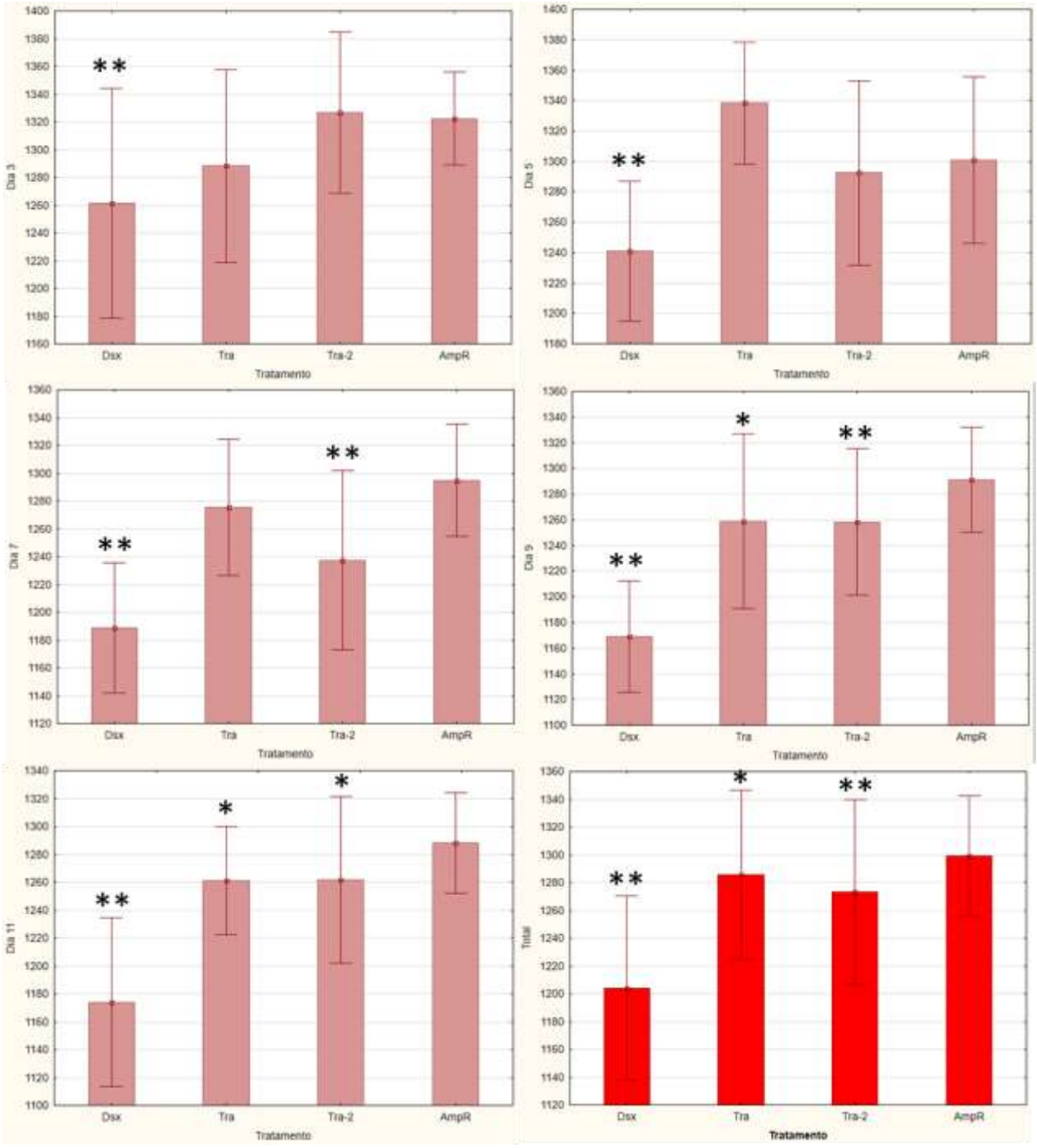


Figura 16 – Tamanhos dos ovos de fêmeas tratadas. Valores representam a média e desvio padrão (dp) expressos em µm, nos diferentes dias de coleta dos diferentes tratamentos (Trat.) e considerando o total de ovos coletadas em cada tratamento. * indicam diferenças de significância < 0,05 e ** valores < 0,001Em todos os casos o teste de ANOVA indicou diferenças significativas entre os tratamentos: Dia 3 – F (3,316) = 8,7596, p = 0,00002. Dia 5 – F (3,194) = 20,671, p = 0,00000. Dia 7 – F (3, 181) = 36,553, p = 0,00000. Dia 9 – F (3,186) = 45,138, p = 0,0000. Dia 11 – F (3, 147) = 41, 163, p = 0,0000. Em destaque (em vermelho) o valor correspondente ao Total – F (3, 860) = 101,79, p = 0,00000.

IV. 4 Morfologia das gônadas

Foi realizada a análise do desenvolvimento das gônadas de machos e fêmeas tratados com dsRNA dos três genes analisados, seguindo metodologia previamente descrita (Chen et al., 2008), com pequenas modificações. Os testículos de machos tratados foram analisados qualitativamente quanto seu aspecto geral (cor e forma) e medidos em seu maior eixo a fim de determinar se o tratamento implicou em alterações de tamanho. As medidas foram comparadas com o controle através de teste de Mann-Whitney. Também foi verificada a presença de espermatozoides móveis, que foi determinada a partir de esmagamento simples em Ringer de inseto.

Em todos os casos foi verificado, ao longo do período analisado, um pequeno aumento no tamanho dos testículos (Fig. 17), como é esperado do desenvolvimento de *Anastrepha*. Entretanto, em nenhum caso o desenvolvimento foi diferente em relação ao controle experimental (Fig. 17, Tab. 6). Além disso, todos apresentaram aspecto morfológico geral semelhante, sem alterações aparentes (Fig. 18), e a presença de espermatozoides móveis, que servem como indicativo da fertilidade desses indivíduos independente do tratamento ao qual foram submetidos. Esses resultados, portanto, indicam que os genes analisados não estão relacionados com o desenvolvimento das gônadas masculinas.

Tabela 6 – Tamanho médio dos testículos (em µm) de machos tratados com os diferentes dsRNA. P valores calculados a partir de teste de Mann-Whitney. NA = não se aplica. Trat. = tratamento.

Trat.	**Dia 0**		**Dia 2**		**Dia 6**		**Dia 10**		**Dia 14**	
	Média	*p*	*Média*	*p*	*Média*	*p*	*Média*	*p*	*Média*	*p*
AmpR	853,8	NA	831,0	NA	1015,5	NA	983,2	NA	975,7	NA
tra	846,6	0,711	806,8	0,589	977,5	0,502	1009,5	0,878	1160,0	0,991
tra2	933,8	0,974	925,5	0,990	1058,3	0,923	946,8	0,497	1018,0	0,900
dsx	994,3	0,997	963,0	0,998	949,3	0,316	1004,8	0,860	111,7	0,994

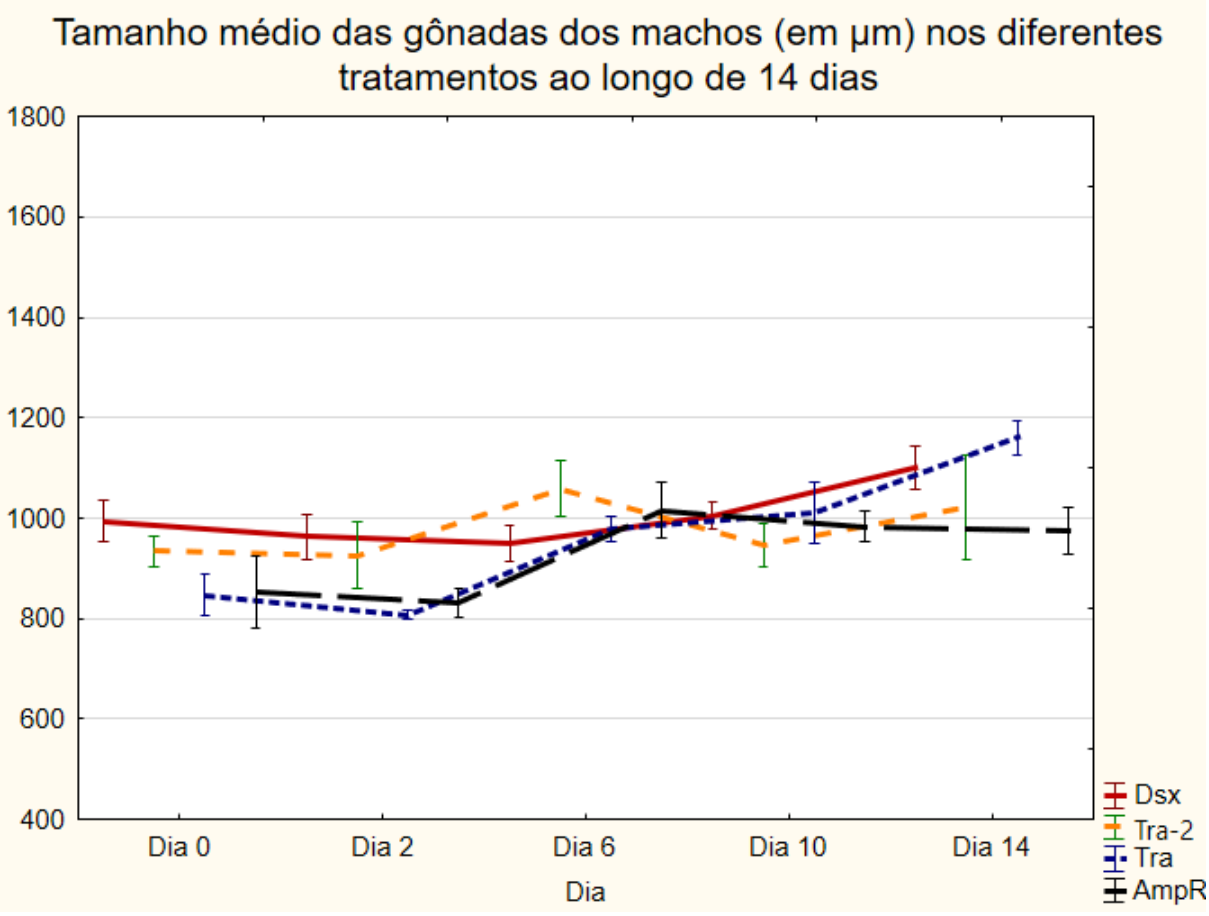


Figura 17 – Tamanho dos testículos (média e desvio padrão, expressos em µm) de machos recém-emergidos tratados com os diferentes dsRNA ao longo de 14 dias.

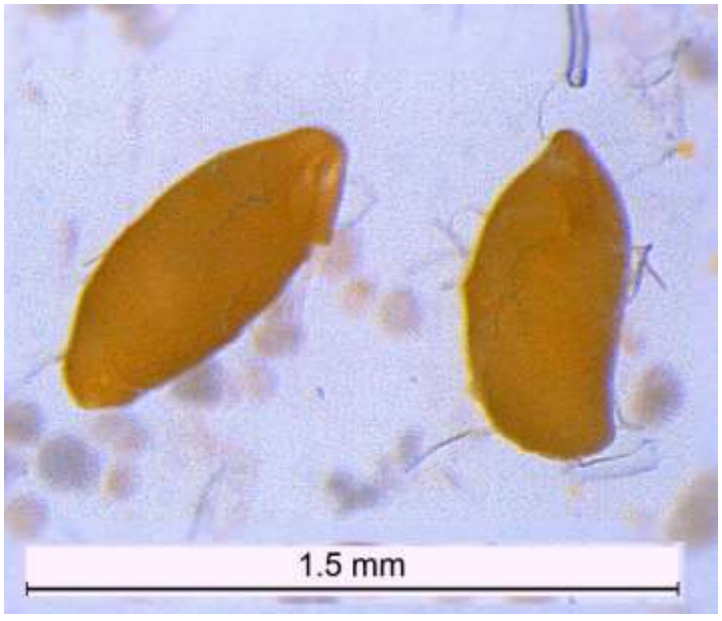


Figura 18 – Testículos de adultos de *A.* sp.1 *aff. fraterculus* tratados com dsRNA. Todos os indivíduos analisados apresentaram morfologia considerada normal para espécie.

No caso das fêmeas, foi observado um aumento mais acentuado do tamanho das gônadas ao longo do período analisado, sendo que no caso do grupo controle as gônadas aumentaram de tamanho em mais de três vezes. A análise preliminar do aspecto geral dos ovários e restante do aparelho genital feminino logo mostrou que as gônadas dos grupos experimentais se desenvolviam de modo mais lento que as verificadas no grupo controle (Fig. 19-20, Tab. 7), permanecendo subdesenvolvidas durante a maior parte do período.

Isso se confirmou junto da medida desses ovários: nos primeiros dias após o tratamento com dsRNA os ovários dos grupos tratados com dsRNA dos genes de determinação sexual era próximo ao controle (exceto o material coletado no dia 0 do grupo tratado com AftradsRNA). A partir do sexto dia após o tratamento, os grupos tratados com AftradsRNA e AfdsxRNA já apresentavam tamanho significativamente menor que o verificado no tratamento controle. Quando os indivíduos atingiram 14 dias após a emergência (e de tratamento com dsRNA), todas as fêmeas dos grupos experimentais apresentaram ovários menores que o verificado no grupo controle. A redução mais proeminente foi verificada no grupo tratado com AftradsRNA, mas não foi observada diferença significativa entre esse tratamento e os demais tratamentos experimentais (Fig. 19-20, Tab. 7). Esses resultados sugerem que todos os genes analisados influenciam no correto desenvolvimento dos ovários, ainda que a capacidade de gerar e colocar ovos férteis seja mantida (ainda que reduzida) em todos os casos (IV.2).

Tabela 7 – Tamanho médio dos testículos (em µm) de machos tratados com os diferentes dsRNA. P valores calculados a partir de teste de Mann-Whitney. NA = não se aplica. Trat. = tratamento.

Trat.	**Dia 0**		**Dia 2**		**Dia 6**		**Dia 10**		**Dia 14**	
	Média	*p*	*Média*	*p*	*Média*	*p*	*Média*	*p*	*Média*	*p*
AmpR	500,2	NA	565,0	NA	1203,7	NA	1388,7	NA	1858,8	NA
Tra	411,5	0,028	459,2	0,149	653,0	0,001	870,5	0,021	808,3	0,000
tra2	479,0	0,504	526,6	0,513	1265,3	0,378	1349,2	0,673	1297,3	0,038
Dsx	579,3	0,998	512,0	0,418	753,1	0,007	881,3	0,024	1270,2	0,030

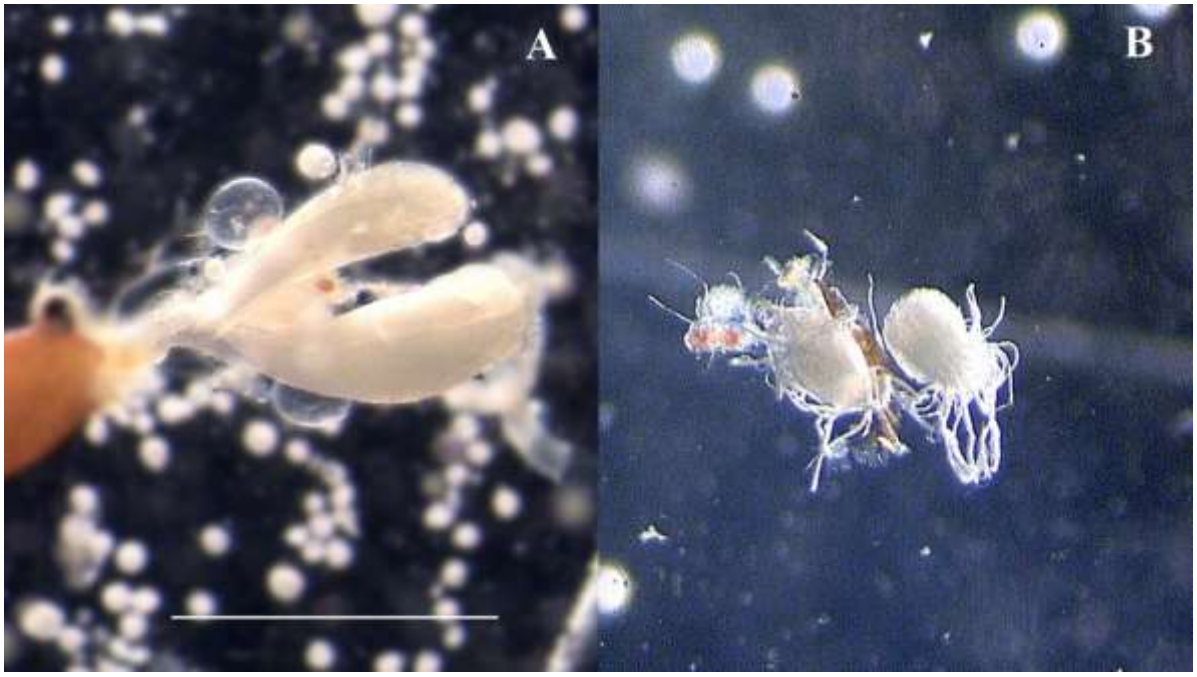


Figura 19 – Ovários de duas fêmeas analisadas 14 dias após tratamento com AmpRdsRNA (A) e AftradsRNA (B).

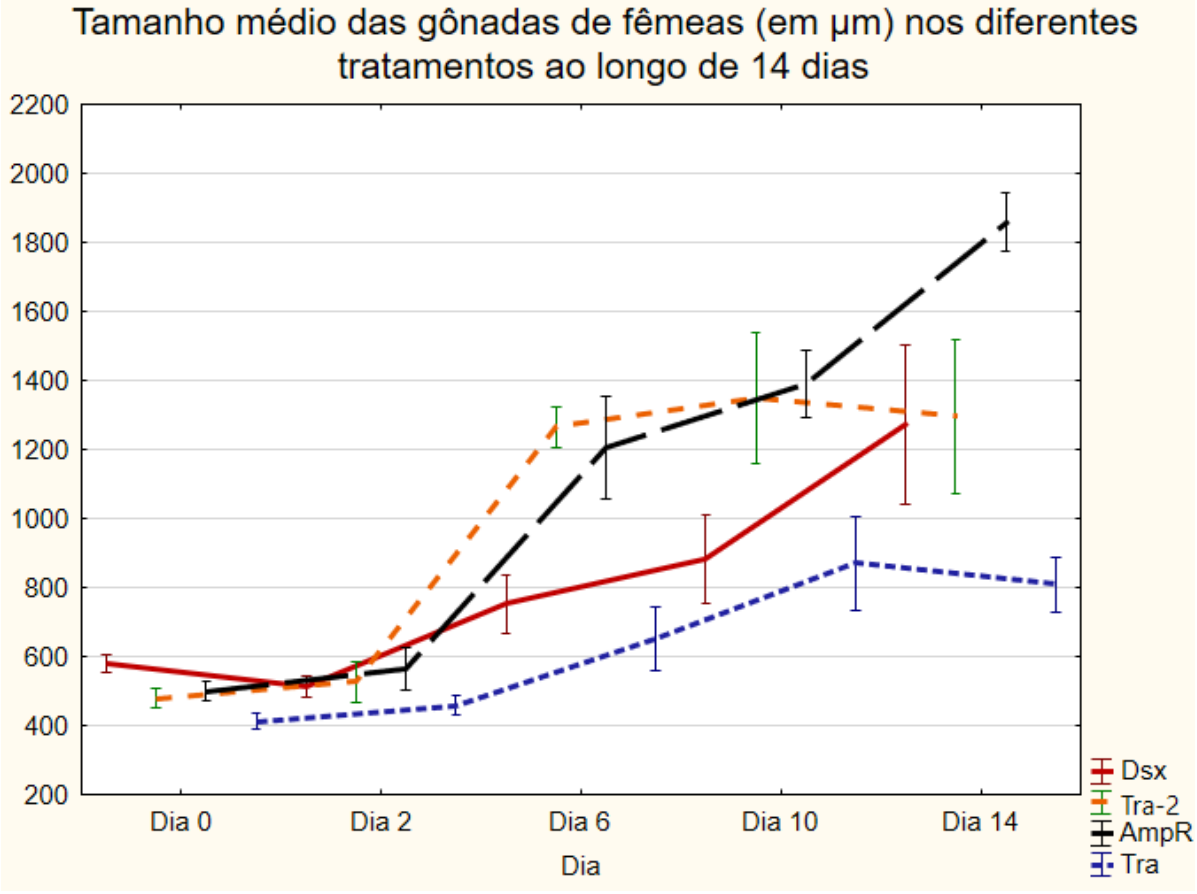


Figura 20 – Tamanho dos ovários (média e desvio padrão, expressos em µm) de fêmeas recém-emergidas tratadas com os diferentes dsRNA ao longo do período experimental.

IV.5 Comportamento reprodutivo

Foi conduzido experimento para análise do comportamento reprodutivo de machos tratados, analisando a frequência da ocorrência das etapas do comportamento reprodutivo de *Anastrepha*, descritas por Cendra e col. (2011). Neste caso, os comportamentos analisados foram: (a) vibração das asas (Vib), (b) emissão de feromônios/inchaço das glândulas abdominais (Fer), (c) interação com fêmea (Int), (d) cópula (Cop), (e) outras atividades (como movimentação, alimentação, hidratação etc.) não relacionadas à reprodução (Nsex) e (f) descanso (Des). A frequência de registro de cada um desses comportamentos foi registrada (Fig. 21-22, Tab. 8), e então as proporções foram comparadas com o controle (tratado com AmpRdsRNA) através de teste χ^2. Os resultados mostraram a existência de alterações comportamentais foram verificadas nos grupos tratados com AftradsRNA (χ^2=12,27435 df = 5 p = 0,031) e com AfdsxdsRNA (χ^2=50,61276 df = 5 p = 0,000), mas não foram detectadas no grupo tratado cm Aftra2dsRNA (χ^2=5,851771 df = 5 p = 0, 321). A frequência de ocorrência de cada um dos comportamentos analisados também foi comparada em relação a ocorrência no grupo controle (através de teste χ^2 por tabela de contingência 2x2 com correção de Yates), para verificar quais dos comportamentos eram os responsáveis pela alteração verificada.

Apesar de o tratamento com AftradsRNA causar alteração no padrão comportamental verificado, não foi possível determinar individualmente qual comportamento estava alterado, embora os resultados apontem para uma redução da frequência geral de comportamentos sexuais e aumento da frequência de comportamentos não relacionados à reprodução (valores p marginais, Tab. 8). Já no caso do tratamento com AfdsxdsRNA, ficou claro que os machos apresentaram menor frequência de vibração de asas, interação com a fêmea e total de atividades sexuais, em conjunto com aumento na frequência de descanso (Fig. 21-22, Tab. 8).

Tabela 8 – Frequência observada dos diferentes comportamentos (Comport.) analisados de machos tratados com diferentes dsRNA, valores do teste χ^2 e p valor. Vib = vibração de asas. Fer = liberação de feromônios. Int = interação com as fêmeas. Cop = cópula. Tsex = total de atividades sexuais (Vib+Fer+Int+Cop). Nsex = atividade não relacionadas à reprodução (como locomoção, alimentação, hidratação etc.). Des = descanso.

Comport.	**AmpR**	**Tra**			**Tra-2**			**Dsx**		
	Obs.	Obs.	χ^2	p	Obs.	χ^2	p	Obs.	χ^2	p
Vib	51	43	,58	,4481	45	,29	,5915	32	4,26	,0391*
Fer	102	93	,41	,5231	91	,64	,4230	113	,59	,4415
Int	117	101	1,32	,2506	123	,14	,7112	71	13,27	,0003*
Cop	16	21	,45	,5028	10	,99	,3204	7	2,85	,0915
Tsex	286	258	2,94	,0865	269	1,04	,3086	223	13,07	,0003*
Nsex	105	131	3,47	,0626	115	,47	,4921	130	3,20	,0735
Des	109	111	,01	,9392	116	,21	,6496	147	7,19	,0073*

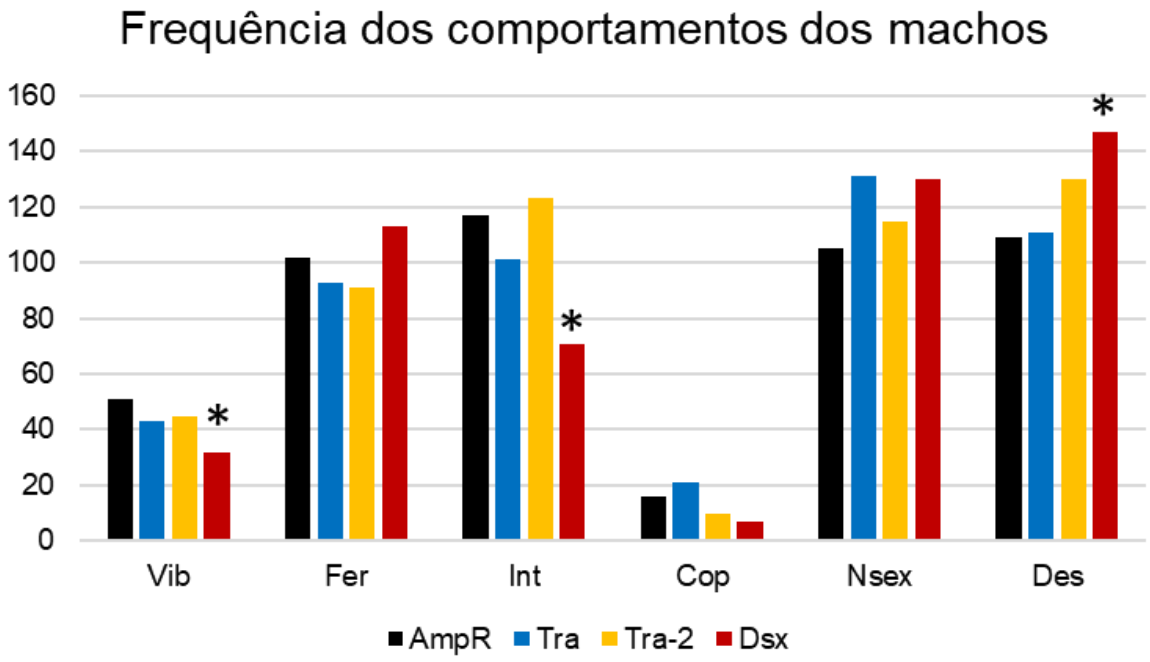


Figura 21 – Frequência observada dos diferentes comportamentos analisados de machos tratados com diferentes dsRNA. Vib = vibração de asas. Fer = liberação de feromônios. Int = interação com as fêmeas. Cop = cópula. Nsex = atividade não relacionadas à reprodução (como locomoção, alimentação, hidratação etc.). Des = descanso. * indica diferenças significativas em relação ao controle.

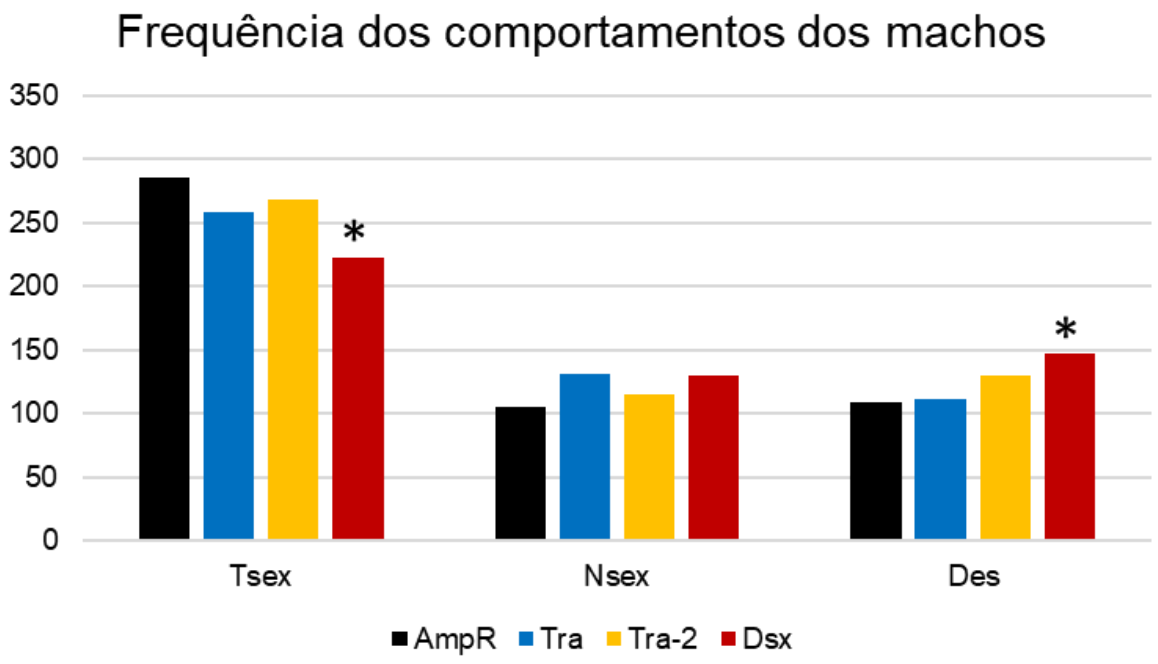


Figura 22 – Frequência observada dos diferentes comportamentos analisados de machos tratados com diferentes dsRNA. Tsex = total de atividades sexuais (Vib+Fer+Int+Cop). Nsex = atividade não relacionadas à reprodução (como locomoção, alimentação, hidratação etc.). Des = descanso. * indica diferenças significativas em relação ao controle.

Também foi conduzido experimento para análise do comportamento reprodutivo de fêmeas. As atividades registradas, segundo as atividades descritas para *Anastrepha* (Cendra *et al*., 2011, modificado) foram: (a) interação com os machos (Int), (b) cópula (Cop), (c) procura de sítio para oviposição (Pso), (d) punctura da oviposição (Punc), (e) arrasto (marcação de feromônios, Arr), (f) outras atividades (como movimentação, alimentação, hidratação etc.) não relacionadas à reprodução (Nsex) e (g) descanso (Des). Os resultados (Fig. 23-24, Tab. 9) indicaram alterações nas frequências comportamentais das fêmeas tratados com AftradsRNA (χ^2=23,87595 df = 6 p = 0,001) e com AfdsxRNA (χ^2=8,77461 df = 6 p = 0,000). Mais uma vez, não foram registradas diferenças significativas no grupo de fêmeas tratadas com Aftra2dsRNA (χ^2=2,531302 df = 6 p = 0,865).

Assim como no caso dos machos, A frequência da ocorrência de cada comportamento também foi comparada em relação ao grupo controle através de χ^2 por tabela de contingência 2x2 com correção de Yates a fim de verificar quais atividades apresentaram frequência alterada (Fig. 23-24, Tab.9). No grupo de fêmeas tratadas com AftradsRNA foi verificada diminuição significativa da atividade de arrasto e da soma das atividades relacionadas à oviposição, junto de aumento na ocorrência de atividades não relacionadas à reprodução. Já no grupo tratado com AfdsxRNA a alteração foi mais intensa, sendo significativa em todos os comportamentos relacionados à oviposição (procura de sítio para oviposição, punctura e arrasto) e a soma desses comportamentos. Entretanto, ao invés de aumento da ocorrência de atividades não relacionadas à reprodução, foi verificado aumento da frequência de registros de descanso.

Tabela 9 – Frequência observada dos diferentes comportamentos (Comport.) analisados de fêmeas tratadas com diferentes dsRNA, valores do teste χ^2 e p valor. Int = interação com machos. Cop = cópula. Pso = procura de sítio de oviposição. Punc = punctura. Arr = arrasto. Tsex = total de atividade sexuais (Int+Cop). Tovip = total de atividades de oviposição (Pso+Punc+Arr). Nsex = outras atividades não relacionadas à reprodução. Des = descanso.

Comport.	**AmpR**	**Tra**			**Tra-2**			**Dsx**		
	Obs.	Obs.	χ^2	p	Obs.	χ^2	p	Obs.	χ^2	p
Int	113	111	,01	,9395	106	,21	,6464	90	2,99	,0837
Cop	21	28	,77	,3794	26	,36	,5501	33	2,37	,1238
Pso	53	40	1,71	,1914	52	1,71	,1914	34	4,08	,0434*
Punc	16	8	2,09	,1481	14	,03	,8529	1	11,73	,0006*
Arr	9	1	4,95	,0261*	7	,06	,8010	0	7,18	,0074*
Tsex	134	139	,08	,7765	132	,01	,9429	123	,52	,4693
Tovip	79	49	7,53	,0061*	73	,19	,6596	35	18,31	,0000*
Nsex	152	184	4,31	,0380*	157	,07	,7843	160	,23	,6328
Des	136	128	,25	,6155	138	,01	,9435	184	10,15	,0014*

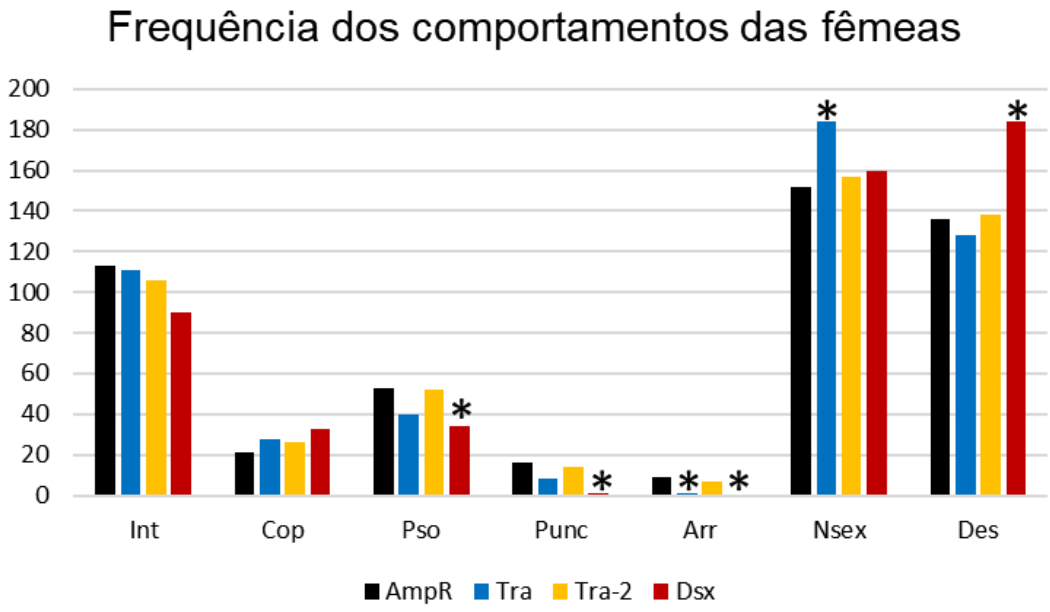


Figura 23 – Frequência observada dos diferentes comportamentos analisados de fêmeas tratadas com diferentes dsRNA. Int = interação com machos. Cop = cópula. Pso = procura de sítio de oviposição. Arr = arrasto. Nsex = atividade não relacionadas à reprodução (como locomoção, alimentação, hidratação etc.). Des = descanso. * indica diferenças significativas em relação ao controle.

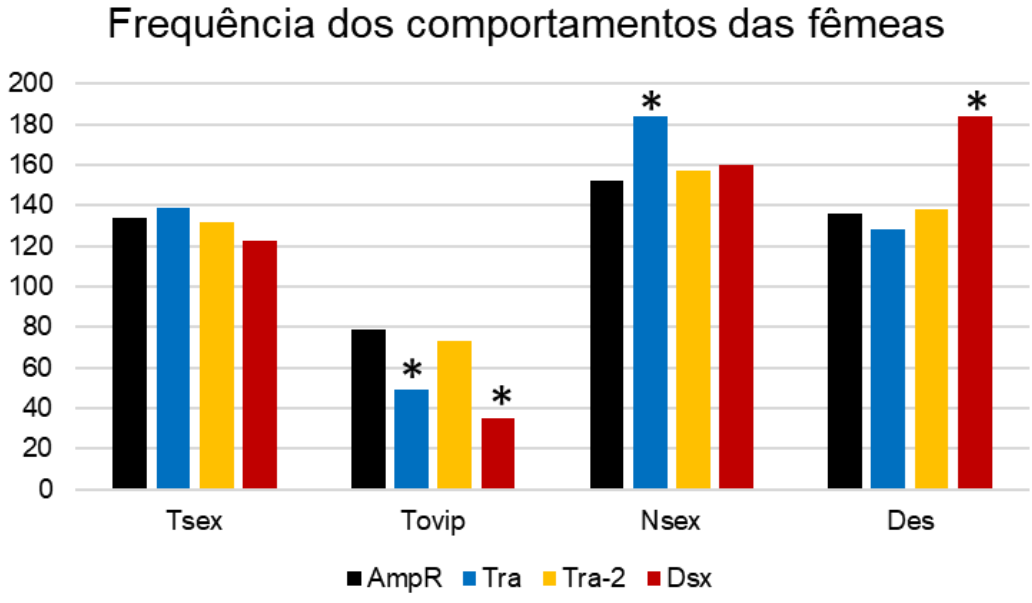


Figura 24 – Frequência observada dos diferentes comportamentos analisados de machos tratados com diferentes dsRNA. Tsex = total de atividades sexuais (Int+Cop). Tovip = total de atividades de oviposição (Pso+Punc+Arr). Nsex = atividade não relacionadas à reprodução (como locomoção, alimentação, hidratação etc.). Des = descanso. * indica diferenças significativas em relação ao controle.

IV.6 Efeito materno

Por fim, foi realizado um procedimento para avaliar os efeitos dos genes em etapas iniciais do desenvolvimento embrionário, através de técnica de RNAi parental (pRNAi). Esta análise foi feita nos moldes já padronizados no laboratório (Vicari *et al*., 2021). Grupos de 15 fêmeas foram tratadas com 2 µg dos diferentes dsRNA (ou 10 fêmeas, no caso do grupo controle) e sua progênie foi recuperada em um período de 10 dias após o tratamento com dsRNA, e então foi avaliada quanto à proporção sexual. A comparação com o grupo controle se deu por teste χ^2 com correção de Yates. Os efeitos esperados envolvem alteração da proporção sexual da progênie a favor de machos no caso de silenciamento do gene *tra-2* (Vicari *et al*., 2021), mas o efeito materno relacionado aos genes *tra* e *dsx* ainda não foi relatado. Sabe-se que o silenciamento gênico de *tra-2* promovido através dessa abordagem resulta em indivíduos com a morfologia sexual altera (Sarno *et al*., 2010; Vicari *et al*., 2021), incluindo deformações na genitália, gônadas assimétricas e mosaicos de estruturas internas masculinas e femininas. Para verificar se isso ocorre nos outros casos, todos os indivíduos obtidos nas progênies das fêmeas tratadas, em um período entre 6 e 10 dias após o tratamento com dsRNA (que corresponde ao período de máxima eficácia do silenciamento gênico, IV.1.3) também foram analisados sob estereomicroscópio quanto ao aspecto geral da sua genitália externa, dissecados em Ringer de inseto e analisados quanto ao aspecto da genitália interna. verificado somente no grupo tratada com *tra*-dsRNA, em período que coincide com a máxima eficácia do silenciamento gênico.

O desvio na proporção sexual a favor de machos foi verificado na progênie de fêmeas tratadas com AftradsRNA e Aftra2dsRNA, mas não foi verificado na progênie das fêmeas tratadas com AfdsxRNA (Fig. 25, Tab. 10). Nenhum dos indivíduos das progênies analisadas apresentavam alterações na

morfologia sexual. Esses resultados sugerem que existe efeito materno na regulação dos genes *tra* e *tra-2* de *A.* sp.1 *aff. fraterrculus*, mas não de *dsx*.

Tabela 10 – Frequência de machos (M) e fêmeas (F) na progênie de fêmeas tratadas com os diferentes dsRNA, considerando diferentes período de tratamento. Abaixo das frequências, segue valor do teste χ^2 com correção de Yates e p-valor do teste.

Trat.	**AmpR**		**tra**		**tra-2**		**dsx**	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Antes	125 (49%)	132 (51%)	92 (48%)	101 (52%)	95 (48%)	102 (52%)	69 (49%)	72 (51%)
			χ^2 = 0,01; p=0,914		χ^2=0,00; p = 0,994		χ^2=0,00; p=0,962	
Dias 1-5	104 (51%)	99 (49%)	88 (53%)	79 (47%)	66 (55%)	54 (45%)	49 (46%)	57 (54%)
			χ^2=0,03; p=0,860		χ^2=0,29; p=0,589		χ^2=0,51; p=474	
Dias 6-5	82 (46%)	95 (54%)	93 (61%)	59 (39%)	96 (59%)	67 (41%)	60 (54%)	51 (46%)
			χ^2=6,66; p=0,009*		χ^2=4,88; p=0,027*		χ^2 = 0,19; p=0,663	
Total Injeção	186 (49%)	194 (51%)	181 (57%)	138 (43%)	162 (57%)	121 (43%)	109 (50%)	108 (50%)
			χ^2=3,92; p=0,478*		χ^2=4,15; 0,416*		χ^2=0,05; p=0,828	

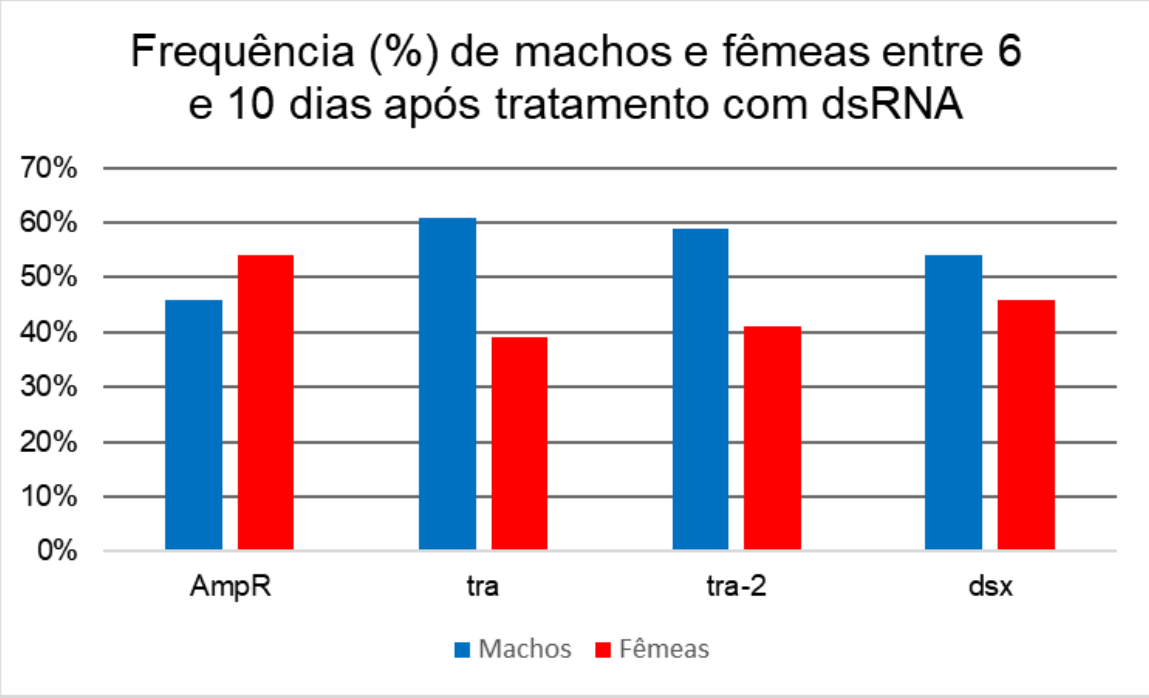


Figura 25 – Frequência de machos (M) e fêmeas (F) na progênie de fêmeas tratadas com os diferentes dsRNA entre 6 e 10 dias após o tratamento. Esse período corresponde ao máximo do silenciamento gênico (IV.1.3).

IV. 7 Resumo dos resultados obtidos

Nas etapas IV.2 a IV.6, indivíduos tratados com AftradsRNA, Aftra2dsRNA e AfdsxdsRNA foram testados quanto aos efeitos conhecidos relacionados a alterações desses genes. Apesar desses efeitos já terem sido relatados, esses relatos são esparsos e não são padronizados, de modo que a comparação entre eles não era possível até então. Ao todo, os indivíduos foram analisados quanto a dez características: fecundidade de fêmeas, fertilidade de fêmeas, proporção de eclosão de ovos, tamanho de ovos, desenvolvimento de gônadas femininas, desenvolvimento de gônadas masculinas, fertilidade de machos (a partir da verificação de presença de espermatozoides móveis), comportamento sexual de machos e de fêmeas e efeito materno. Apenas não foram verificadas alterações significativas no desenvolvimento de gônadas masculinas e fertilidade masculina. Um resumo das alterações verificadas encontra-se abaixo. Esse panorama é importante e serve de base para a discussão geral a qual se propõe esse estudo: determinar quais desses genes apresenta maior grau fenotípico de pleiotropia, como forma de relacionar com as hipóteses de evolução da cascata gênica de determinação sexual em *Anastrepha*.

Tabela 11 – Resumo dos resultados obtidos a partir do tratamento de dsRNA dos três genes analisados para cada uma das características fenotípicas analisadas. X indica alteração. XX indica alteração expressiva (maior que os demais genes). – indica ausência de alteração.

Fenótipo	**tra**	**tra-2**	**dsx**
Fecundidade	X	-	X
Fertilidade	X	-	X
Proporção de eclosão	-	-	X
Tamanho dos ovos	X	X	XX
Morfologia de gônadas femininas	X	X	X
Comportamento sexual de machos	-	-	X
Comportamento sexual de fêmeas	X	-	XX
Efeito materno	X	X	-

V – Discussão

A expressão *pleiotropia* foi definida originalmente, há mais de 110 anos, como "(...) uma unidade de herança é pleiotrópica se várias características dependem dela; essas características então irão sempre aparecer juntas e podem estar correlacionadas" (Plate, 1910). Desde então esse conceito tem tido papel central, tanto teórico quanto experimental, em muitas pesquisas nas áreas de genética, biologia molecular, evolução, desenvolvimento, medicina e fisiologia (Stearns, 2010). Atualmente, a expressão *pleiotropia* pode ser amplamente definida como o fenômeno no qual um gene afeta diversos fenótipos (Zhang & Wagner, 2013). O conceito se tornou canônico dentro da genética, e é amplamente presente não só como alvo da pesquisa científica em questão, mas também subjacente a diversos outros temas dentro da biologia e até do ensino de genética.

Entretanto, as diferenças na abordagem do estudo da pleiotropia entre diferentes áreas de estudo levou a incongruências na forma como esse conceito é percebido, medido e interpretado por pesquisadores de diferentes áreas (Stearns, 2010). Desse modo, apesar de ser uma expressão de definição geral bastante simples e direta, os detalhes e desdobramentos de sua interpretação e aplicação prática podem ser bastante distintos. O conceito de pleiotropia depende diretamente do conceito de fenótipo, e a própria definição de fenótipo depende da escala de observação. Logo, a definição de pleiotropia também depende deste fator (Figuero & Calleros, 2018), e pode ter diversas interpretações (Paaby & Rockman 2013; Stoney *et al*., 2015).

Tendo isso em vista, Paaby e Rockman (2013) sugerem três formas pelas quais o conceito *pleiotropia* pode ser entendido. Segundo eles, são três *tipos* de pleiotropia não excludentes entre si, que se baseiam em diferentes interpretações de *gene* e de *fenótipo*: (a) a pleiotropia genética-molecular (*genetic-molecular pleiotropy*) se refere ao número de funções de um gene, geralmente medida a

partir das várias interações que as proteínas traduzidas a partir dele podem fazer ou pelos efeitos que a perda da função de um gene pode causar; (b) a pleiotropia do desenvolvimento (*development pleiotropy*), na qual a unidade de análise não é o gene, mas sim uma mutação isolada, uma vez que diferentes mutações em um mesmo gene podem ter efeitos diversos no desenvolvimento ontogenético; e a pleiotropia seletiva (*selective pleiotropy*) na qual o foco não são efeitos isolados, mas sim o impacto de variantes genéticas no valor adaptativo dos indivíduos que as carregam. Ainda que essa classificação possa ser discutida (Zhang & Wagner, 2013), ela é relevante na medida em que chama atenção pelo modo pelo qual diferentes interpretações de um mesmo conceito podem surgir dependendo do foco da análise do trabalho. Os autores que a propuserem argumentam que o fundamental para o estudo da pleiotropia é que os pesquisadores tenham em mente com qual definição de pleiotropia estão trabalhando, e quais são as limitações dessa abordagem. No presente estudo, avaliou-se diversos efeitos que a perda da função dos genes de determinação causa, o que aproxima o conceito de pleiotropia aqui abordado com a pleiotropia genética. Entretanto, optou-se por delimitar a análise a efeitos reprodutivos, com impacto na aptidão dos indivíduos, o que aproxima da definição de pleiotropia seletiva.

Para além da questão da definição de pleiotropia, é importante notar que muitas vezes é difícil demonstrá-la, ainda mais mensurá-la, dependendo da abordagem utilizada, seja por questões técnicas ou conceituais (Stearns, 2010). Nas últimas décadas, métodos de análise em larga em escala, sobretudo através de análises de genética reversa e por *QTLs* (*quantitative trait loci*), têm sido utilizados com sucesso como ferramentas para estimar graus de pleiotropia, principalmente sob a perspectiva de testar as hipóteses de pleiotropia universal, postulado que afirma que cada gene é capaz de afetar todas as características de um indivíduo (Fisher, 1930; Wrigth, 1968), ideia que não foi corroborada pelas evidências obtidas. Entretanto, recentemente tem-se pensado nas limitações desse tipo de abordagem. Dentre essas limitações, métodos de análise genética em larga

escala adotam diferentes padrões do que seria pleiotropia alta ou baixa, diferentes estratégias de como estimar pleiotropia através de análises "ômicas" (genômicas, transcriptômicas ou proteômicas etc.) e, acima de tudo, às suposições estatísticas utilizadas para as análises (Zou *et al*., 2008; Paaby & Rockman, 2013). Além disso, essas análises subestimam os níveis de pleiotropia, uma vez que parte da variação pleiotrópica existente é perdida na forma de variações genéticas letais, mas que ainda assim possuem importante valor em um estudo evolutivo (Paaby & Rockman, 2013). Ademais, e talvez o ponto mais importante seja que, ao estudar pleiotropia, a questão principal não é a quantidade de proteínas que são afetadas de uma maneira estatisticamente significativa, mas sim os efeitos biológicos nos organismos portadores da alteração em questão (Zhang & Wagner, 2013). Por isso, faz-se necessário utilizar métodos que abordem a pleiotropia de maneira empírica, em especial métodos que envolvam uma abordagem biológica experimental (Paaby & Rockman, 2013; Zhang & Wagner 2013).

As previsões sobre a pleiotropia podem ser testadas com base nos efeitos relacionados à seleção agindo sobre determinado loco. Esses métodos são baseados na simples suposição de que um loco controlando alguma característica sob seleção terá efeitos pleiotrópicos que reduzem a aptidão do indivíduo (Keightly & Hill, 1990; Otto, 2004; Kirkpatrick, 2009). Este princípio já foi demonstrado em *Drosophila* (Clayton *et al.*, 1956). Assim, medidas de aptidão relacionada ao silenciamento gênico de determinados locos podem ser um método bastante simples de mensurar a pleiotropia relacionada a estes. Métodos de silenciamento gênico também podem produzir efeitos fenotípicos limitados e mensuráveis (Sönnichsen *et al.*, 2005; Stearns, 2010), como alterações no tamanho ou massa de diversas características. Uma combinação dessas duas abordagens foi justamente o que foi utilizada neste trabalho, em que se mediu uma série de atributos relacionados à aptidão (como fecundidade, fertilidade e frequência de comportamentos reprodutivos) a partir do silenciamento gênico de *transformer*, *transformer-2* e *doublesex* de uma espécie de *Anastrepha*, os quais

pretendia-se testar o grau de pleiotropia. Neste estudo, o teste do grau de pleiotropia se deu a partir da perspectiva de testar duas diferentes hipóteses que explicam a evolução da cascata genética de determinação sexual em insetos, e se baseiam na relação entre o grau de pleiotropia e a diversidade molecular desses genes. Dessa forma, antes de explorar os resultados obtidos é importante fazer algumas considerações a esse respeito.

O conceito de pleiotropia tem tido um papel central em teorias de facilitação, restrição ou até direcionamento da seleção (Hawthorne & Via 2001; Reusch & Wood 2007; Latta & Gardner 2009). Alguns estudos sugerem que genes com alto grau de pleiotropia tendem a ser mais estabilizados por seleção natural (Stearns, 2010). Assim, a pleiotropia restringiria a diversificação genética (Fisher, 1930; Orr 2000; Wagner & Zhang, 2011; Connallon & Hall, 2018). Isso ocorre pois as eventuais mutações nesses genes seriam altamente deletérias ao afetar inúmeros fenótipos, o que aumentaria o grau de seleção purificadora no loco em questão. Esse padrão vem sendo observado em uma série de organismos, incluindo invertebrados (Fitzpatrick, 2004), vertebrados (Papakostas *et al*., 2014; Hu *et al.*, 2017) e plantas (Mitchell-Olds, 1996; Auge *et al.*, 2019). Desse modo, é bastante fundamentada a previsão feita por Eirin-López e Sánchez (2015) que relacionam o grau de pleiotropia com o grau de variabilidade dos genes da cascata de determinação sexual de insetos.

Nesse estudo, os autores se propuseram a mensurar, através de análises de diversidade genética *in silico*, a diversidade dos genes *transformer*, *transformer-2* e *doublesex* (e *Sex-lethal*, que tem função de determinação sexual em *Drosophila*) como forma de testar duas hipóteses que explicam a evolução desta cascata. A primeira é a hipótese conhecida como base-topo (do inglês *bottom-up*), proposta inicialmente por Wilkins (1995) e amplamente discutida até os dias de hoje (Pomiankoswki *et al.*, 2004; Verhulst *et al.*, 2010; Eirin-López & Sánchez, 2015; Meisel, 2020; Adolfi *et al.*, 2021), postula que a evolução da cascata de determinação sexual em insetos envolveu a aquisição de genes reguladores que

foram sendo adicionados ao topo. Sob esse modelo, os genes da base se manteriam mais conservados ao longo do tempo, devido a seleção purificadora que atua mantendo inalterada a determinação dos fenótipos sexuais (Verhulst *et al.*, 2010). Em outras palavras, esses genes teriam um grau maior de pleiotropia, uma vez que atuam diretamente como fatores de citodiferenciação que regulam a expressão de vários outros genes. Já os genes do topo seriam menos pleiotrópicos, e seria improvável que pequenas alterações em sua estrutura devido a mutações pontuais comprometessem sua única função de promover o *splicing* sexo-específico dos genes logo abaixo na cascata (Marin & Baker, 1998; Verhulst *et al.*, 2010; Eirín-Lopez & Sánchez, 2015).

A outra interpretação é possível, é a hipótese de restrições no desenvolvimento. Segundo essa hipótese, mutações nos genes envolvidos em aspectos mais iniciais do desenvolvimento (ou seja, os do topo da cascata) teriam um custo adaptativo maior, pois mutações que ocorram neles afetariam a expressão dos genes que eles regulam. Nesse caso os genes do topo estariam sujeitos a níveis maiores de seleção purificadora, enquanto os genes da base acomodariam melhor essas mudanças e, portanto, mudariam mais ao longo do tempo (Artieri *et al.*, 2009; Morrow *et al.*, 2014). Nesta perspectiva, os genes do topo seriam mais pleiotrópicos, uma vez que alterações neles afetariam todos os genes regulados por ele, que estariam abaixo dele na cascata. Sabe-se que, em *Drosophila*, o gene *transformer* regula também a expressão do gene *fruitless*, que está relacionado a aspectos comportamentais. Caso o gene do topo tenha outras funções além de controlar apenas um gene abaixo dele na cascata isso o torna mais pleiotrópico que os genes abaixo dele.

Na análise *in silico* supracitada (Eirin-López & Sánchez, 2015) concluiu-se que os genes da base dessa cascata apresentam maior variabilidade que os do topo, sendo que o gene com mais grau de diversidade encontrado foi o *Sxl*. Isso estaria de acordo com a segunda interpretação da evolução desta via. Entretanto, ainda segundo a análise, o gene *transformer*, que corresponde ao topo da cascata

na grande maioria das espécies analisadas, foi o que evoluiu mais rápido nas espécies analisadas. Além desta aparente incongruência, o trabalho não faz testes em relação ao grau de pleiotropia dos genes em questão, apesar de fazer assunções quanto a essa característica. Além disso, como dito anteriormente, a questão biológica por trás da maioria das investigações é o efeito nos organismos em questão. E nesse contexto, o presente estudo trouxe alguns elementos que contribuem para essa discussão.

De modo geral, o gene que apresentou maior grau de pleiotropia, dentre os fenótipos analisados foi o *doublesex*, que apresentou alterações significativas em relação a fecundidade, fertilidade, proporção de eclosão, tamanho das gônadas femininas e dos ovos e comportamento reprodutivo de machos e fêmeas. Em relação ao tamanho dos ovos, adicionalmente, observou-se que o efeito relacionado ao silenciamento de *doublesex* foi significativamente maior do que em relação aos outros genes analisados. Quanto ao comportamento reprodutivo, as diferenças também foram mais conspícuas no caso do silenciamento do gene *doublesex*, sendo que um maior número de parâmetros comportamentais analisados foi alterado.

O gene do topo da cascata, *transformer*, não apresentou relação com a proporção de eclosão dos ovos, e as alterações comportamentais registradas foram menores que o gene da base, *doublesex*. Essas observações estão de acordo com a hipótese base-topo de evolução da cascata de determinação sexual (Wilkins, 1995). No caso, originalmente o gene *doublesex* controlaria a determinação sexual nos insetos, e sua função atuaria de modo a garantir o desenvolvimento adequado dos fenótipos masculino ou feminino. A partir da incorporação do gene *transformer* ao topo da cascata este se tornou o regulador, porém, o gene *doublesex* continua tendo maiores efeitos na determinação do fenótipo sexual. Assim, mutações pontuais na estrutura do gene *transformer* que não comprometam a sua função de regular o *splicing* sexo-específico de *doublesex* tenderiam a ser acumuladas na estrutura do gene. Mesmo aquelas mutações que

causassem perda total da atividade deste, não seriam necessariamente letais: elas levariam ao surgimento de pseudomachos (XX), que são viáveis e tem sua fertilidade incerta em tefritídeos (Schetelig *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015; Vicari *et al*., 2021). Enquanto isso, mutações no gene da base, devido às diversas funções exercidas por ele, causariam maiores perturbações e seriam eliminadas por seleção purificadora.

Essa constatação está de acordo com as análises *in silico* de diversidade proteica (Eirin-Lopez & Sánchez, 2015), o que corrobora a relação entre pleiotropia e diversidade genética, o que encoraja novos trabalhos a utilizarem essa abordagem. Isso pode ser importante sobretudo no caso de organismos não-modelo, como o caso dos tefritídeos. Entretanto, pode-se argumentar que a pleiotropia medida da forma como foi não é adequada para medir a variação fenotípica que seria advinda de mutações pontuais, uma vez que o silenciamento por RNAi não simula alterações pontuais, mas sim a perda da função inteira de um gene.

De fato, nesse trabalho, a pleiotropia medida se refere a pleiotropia genética, que é a pleiotropia referente ao fragmento total do gene silenciado. Esta é diferente da pleiotropia do desenvolvimento, que se refere aos efeitos pleiotrópicos advindos de alterações pontuais na sequência de um gene (Stearn, 2000, Paaby & Rockman, 2013). Entretanto, esse tipo de abordagem ainda pode ser utilizado, uma vez que a pleiotropia genética constitui uma soma das alterações pontuais que surgem ao longo do processo evolutivo (Wagner & Zhang, 2011). Essa opção, de analisar pleiotropia a partir do silenciamento de genes completos é, ainda, vantajosa, uma vez que a perda de atividade geral de um gene tem efeitos mais diretos e conspícuos que os oriundos de uma mutação pontual (Wagner & Zhang, 2011). Com isso em mente, é possível concluir que o gene *transformer*, considerando a soma das alterações pontuais que surgem ao longo do processo evolutivo, é menos pleiotrópico que o gene *doublesex*. No caso dos experimentos aqui conduzidos, a diminuição da atividade do *transformer*

não foi suficiente para alterar tantos fenótipos quanto a diminuição direta de *doublesex*.

Em situação natural, a falta de atividade do gene *transformer* leva ao padrão de *splicing* específico de machos dos produtos do gene *doublesex*. Como os efeitos verificados se deram em relação a fenótipos femininos, é possível que, ao fazer o silenciamento de *transformer*, na ausência da proteína Tra funcional nos indivíduos tratados, eles passaram a produzir proteína Dsx^M, e essa seja a causa das alterações verificadas nesses indivíduos. Já no caso dos indivíduos tratados com *doublesex*, o silenciamento promove a falta de proteína tanto nos machos como nas fêmeas. Essa falta de proteínas que atuam diretamente na determinação de vários aspectos sexuais e reprodutivos aparentemente tem efeitos maiores nos fenótipos analisados em ambos os sexos.

O gene *transformer-2*, por sua vez, se mostrou o gene com menores efeitos pleiotrópicos observados, sendo que o seu silenciamento acarretou a redução do desenvolvimento dos ovos e das gônadas femininas. Na análise de diversidade molecular (Eirin-López & Sánchez, 2015), verificou-se que esse é o gene mais conservado na cascata de determinação sexual de insetos. Entretanto, não se pode dizer que o gene *transformer-2* seja a base ou o topo da cadeia, apesar de também não ser exatamente um intermediário. Diferente do que ocorre com o *transformer*, os produtos dos genes *transformer-2* estão presentes em ambos os sexos (Sarno *et al.*, 2010). Ainda assim, a partir da formação de um complexo Tra-Tra2 ele atua na determinação do fenótipo feminino, sendo que sua expressão é fundamental para o desenvolvimento de fêmeas (Salvemini *et al.*, 2009; Sarno *et al*., 2010; Schetelig *et al*., 2012; Liu *et al.*, 2015; Baki *et al*., 2020; Vicari *et al*., 2021). Entretanto, sabe-se que o silenciamento do gene *transformer-2* sozinho não provoca tantas alterações quanto quando se combina seu efeito com o de *transformer* (Schetelig *et al*., 2012; Liu *et al*., 2015), e ele sozinho não é capaz de assegurar o fenótipo feminino (Schetelig *et al*., 2012; Liu *et al*., 2015). Isso pode explicar o porquê de o gene *transformer-2* ter causado menos alterações, ainda

que seja o mais conservado. Os fatores que determinam a conservação do gene *transformer-2* ainda precisam ser elucidados, sendo que é possível que existam outros efeitos fenotípicos desconhecidos e que não foram obsevardos.

Diante disso, e de outros questionamentos, pode-se argumentar que os fenótipos analisados neste trabalho são poucos ou ao menos insuficientes para analisar a pleiotropia de cada gene. De fato, é possível que os genes sejam responsáveis por efeitos que não foram diretamente mensurados. Entretanto, é importante ressaltar alguns pontos. De acordo com a classificação proposta por Paaby e Rockman (2013), o conceito de pleiotropia do contexto desse trabalho é algo entre a pleiotropia genética molecular e a pleiotropia seletiva, sendo que o foco desta última é o impacto das variações no valor adaptativo dos organismos. Como dito anteriormente, a pleiotropia pode ser testada com base na seleção agindo sobre diferentes locos, com base na suposição de que um loco que controla uma característica sob seleção terá efeitos pleiotrópicos que reduzem a aptidão (Keightly & Hill, 1990; Otto, 2004; Kirkpatrick, 2009). Apesar de evoluírem relativamente rápido, os genes de determinação sexual estão claramente sob seleção, assim como muitos genes que atuam no desenvolvimento, uma vez que perturbações podem comprometer o desenvolvimento adequado de características de aptidão (Eirin-López & Sánchez, 2015). As características testadas nesse trabalho estão relacionadas à aptidão dos organismos, uma vez que se trata de características reprodutivas e/ou sexuais, como fertilidade, fecundidade e comportamento reprodutivo. Quando se estuda organismos não modelo esse tipo de abordagem é fundamental pois permite mensurar de modo apropriado a pleiotropia do sistema.

Essa perspectiva é importante para outro questionamento: o que é pleiotrópico para *Anastrepha* também é pleiotrópico para outros insetos? A função dos genes de determinação sexual é relativamente conservada nos insetos ainda que os mecanismos moleculares subjacentes sejam diversificados (Verhulst *et al.*, 2010). Fazer comparações fenotípicas utilizando a estratégia de análise

empírica aqui abordada entre grupos distantes é pouco informativa, uma vez que a variável filogenética se torna um obstáculo para interpretação e coleta de resultados. A análise com base na aptidão de organismos de uma só espécie, como feito aqui, é mais adequada, uma vez que se visou fazer uma comparação entre os genes e não entre espécies. Esse outro tipo de estudo, ainda assim, pode ser muito informativo. Ao estudar pleiotropia, pesquisadores se valeram de diferentes técnicas, incluindo a comparação com grupos próximos, para explorar as vias moleculares de ação de vários genes, e assim começaram a ter entendimento sobre diversos desses mecanismos (Mauro & Ghalambor, 2020). Esse tipo de análise, sobretudo a partir de comparação com organismos-modelo (como *Drosophila*) podem ajudar a desvendar como os genes analisados se relacionam com esses fenótipos nos tefritídeos.

Apesar dessa relação não estar clara, os resultados obtidos trazem algumas observações importantes a esse respeito, na medida em que se pode traçar relações entre eles. Sabe-se que a alteração no tamanho dos ovos está relacionada à diminuição da expressão de proteína de vitelo causada por silenciamento de Dsx^F em *Bactrocera dorsalis* (Chen *et al*., 2008). O mesmo fenômeno pode ter ocorrido aqui, uma vez que a partir do silenciamento de todos os genes analisados foi verificada a redução no tamanho dos ovos. Sendo o vitelo um aporte fundamental para o desenvolvimento embrionário, é de se esperar que isso resulte em uma redução da sobrevivência desses ovos, impactando a proporção de eclosão e a fertilidade. O gene *yolk protein* ainda não foi caracterizado em *Anastrepha*, mas a relação de sua expressão com a sobrevivência e viabilidade de ovos pode ser futuramente explorada.

Não se sabe o mecanismo genético envolvido na maturação das gônadas femininas, mas os resultados obtidos sugerem que todos os genes analisados atuam nesse processo. Entretanto, foi possível notar a presença de ovos bem formados no interior dos ovários subdesenvolvidos das fêmeas tratadas com dsRNA. Isso está de acordo com a observação de que esses ovários menores

produzem ovos menores e uma quantidade menor de ovos, ou seja, o tamanho das gônadas está relacionado com a diminuição da fertilidade. Algumas das alterações comportamentais das fêmeas também podem se relacionar a esse fator: com uma quantidade menor de ovos sendo produzidos por suas gônadas, é de se esperar que as fêmeas apresentem uma menor frequência do comportamento de oviposição. Entretanto, outros detalhes dessas realizações, como a diferença do padrão encontrado entre o silenciamento gênico de *transformer* e *doublesex* (o primeiro resultou em aumento de outras atividades não relacionadas à reprodução, enquanto o segundo resultou em aumento da ocorrência de períodos de descanso) podem estar relacionados a outros fatores, incluindo fatores que atuem a nível neurológico e que se relacionem ao comportamento (Teixeira, 2017). Contudo, a relação entre os genes de determinação sexual e fatores desse tipo não são conhecidos para espécies de tefritídeos.

Nos machos, de modo geral, as alterações verificadas foram mais sutis. Em primeiro lugar, não foram verificadas alterações na fertilidade potencial dos machos (verificada a partir da presença de espermatozoides móveis no interior dos testículos) e nem no desenvolvimento das gônadas. Duas interpretações são possíveis: a primeira é que esses genes não atuam nesses processos nos machos, e a segunda é que eles atuam, mas em uma etapa anterior do desenvolvimento ontogenético. A etapa em que se realiza o silenciamento gênico é determinante dos efeitos gerados a partir desse silenciamento. No trabalho, buscou-se estudar os efeitos do silenciamento gênicos em adultos, uma vez que os efeitos embrionários resultam em alterações fenotípicas que inviabilizariam a análise aqui proposta (Sarno *et al.*, 2010; Vicari *et al.*, 2021). Sabe-se que o desenvolvimento das gônadas de machos ocorre em momento anterior ao das fêmeas, sendo que é comum que os adultos emerjam com os testículos em grau avançado de desenvolvimento. Além disso, naturalmente não era esperada nenhuma alteração significativa no caso de machos tratados com AftradsRNA, uma vez que eles já não expressam proteína Tra funcional naturalmente. Quanto

às alterações comportamentais, mais uma vez a falta de conhecimento em relação à genética destes processos permite apenas a especulação, entretanto o que os dados sugerem é justamente que o gene *doublesex*, de algum modo, afete o comportamento de machos adultos de *Anastrepha*. É possível que essas alterações estejam relacionadas à expressão do gene *fruitless*, que em outros insetos é regulado diretamente pela atividade de *transformer* e *doublesex* e cuja alteração da expressão também resulta em alterações comportamentais em *Anastrepha*.

Em um dos experimentos foi testada a ocorrência de efeito materno, ou seja, o silenciamento gênico foi feito nas mães e os efeitos fenotípicos foram verificados na progênie. Esse efeito já havia sido demonstrado para o gene *transformer-2* (Vicari *et al.*, 2021) mas não para *transformer* e *doublesex*, com o efeito mais conspícuo obtido a partir do silenciamento desse gene um desvio da proporção sexual a favor dos machos. A atual hipótese da determinação sexual em tefritídeos leva em conta que os embriões recebem proteínas Tra e Tra2 materna que atuam de modo a promover o *splicing* sexo-específico de seus produtos até que a função autorregulatória do *transformer* esteja estabelecida. Nos machos, a presença de um fator masculinizante no cromossomo Y impediria esse processo, o que resultaria na formação da proteína Tra masculina. Os dados obtidos corroboram essa hipótese, sendo que esse efeito foi também verificado para o silenciamento de *transformer*, indicando que a proteína Tra materna, além da Tra2, é fundamental para a determinação do fenótipo feminino em etapas iniciais do desenvolvimento embrionário. Ao que tudo indica não há transmissão de proteína Dsx^F, uma vez que seu silenciamento não resultou em nenhuma alteração visível na progênie analisada.

Por fim, é importante ressaltar que os dados aqui obtidos também têm suma importância a partir de uma perspectiva aplicada. Existem estudos que sugerem a aplicação de dsRNA de genes de determinação sexual como parte de estratégias de controle populacional de moscas-das-frutas (Häcker & Schetelig, 2021; Réndon & Enkerlin, 2021). Como a alteração na expressão desses genes

potencialmente dá origem ao desenvolvimento de pseudomachos estéreis, de modo geral sugere-se que a oferta desses componentes a indivíduos selvagens pode causar alterações desejáveis na proporção sexual residente, ou então a aplicação de dsRNA em biofábricas para a produção de machos a serem utilizados em aplicações da técnica de inseto estéril (Sarno *et al.*, 2010; Schetelig *et al*., 2012; Liu *et al*., 2015; Baki *et al*. 2020; Dias *et al.*, 2020; Maktura *et al*., 2021; Vicari *et al*., 2021). Entretanto, a eficácia dessas abordagens se baseia na capacidade desses machos competirem com os machos residentes e copularem com as fêmeas do campo. Os dados mostram que manipulações na expressão de genes de determinação sexual podem acabar reduzindo a aptidão dos indivíduos, o que pode comprometer a eficácia de algumas dessas estratégias. Por outro lado, as informações obtidas também podem servir de base para o desenvolvimento de outras estratégias baseadas em RNAi. Por exemplo, pode-se imaginar a possibilidade de ofertar dsxfdsRNA através de alimentação com atrativos em larga escala para fêmeas do campo (Häcker & Schetelig, 2021; Réndon & Enkerlin, 2021). Isso poderia causar uma redução desejável na quantidade de oviposição em uma fruticultura, sem o uso de agrotóxicos. A exequibilidade de um sistema assim ainda deveria ser testada, mas o exemplo ilustra como o conhecimento aqui obtido pode ser útil no desenvolvimento dessas estratégias.

Em suma, os resultados aqui apresentados sugerem que, em *Anastrepha*, o elemento da base da cascata de determinação gênica (*dsx*) apresenta mais efeitos pleiotrópicos que o elemento do topo (*tra*). Isso está de acordo com o verificado anteriormente para a diversidade genética (Eirin-Lopez & Sánchez, 2015) e com a hipótese de base-topo (Wilkins, 1995). O gene *tra*-2 por sua vez apresenta-se como o menos pleiotrópico, ainda que mais conservado. Além disso, o trabalho também contribuiu para uma melhor compreensão e caracterização da função dos genes analisados nos tefritídeos, o que é relevante tanto em uma perspectiva teórica quanto a aplicada, considerando propostas de controle populacional desses insetos-praga.

VI – Conclusões

Através deste estudo pode-se concluir que:

- o silenciamento gênico de *transformer* causou redução da fecundidade e da fertilidade de fêmeas, redução no tamanho dos ovos, redução da ocorrência do comportamento de oviposição, e aumento da ocorrência de comportamentos não relacionados à reprodução;
- o silenciamento gênico de *transformer-2* causou redução do tamanho dos ovos e no tamanho dos ovários;
- o silenciamento gênico de *doublesex* causou redução da fecundidade e da fertilidade de fêmeas, redução da proporção de eclosão e do tamanho dos ovos, redução no tamanho dos ovários, diminuição do comportamento de oviposição com aumento da ocorrência de descanso em fêmeas e diminuição de comportamentos sexuais em machos com aumento da ocorrência de descanso;
- existe relação entre o grau de pleiotropia dos genes *transformer* e *doublesex* e a diversidade molecular desses genes (mensurada na literatura);
- o gene da base da cascata de determinação genética (*doublesex*) apresentou maior pleiotropia que o gene do topo (*transformer*), o que está de acordo com o previsto pela hipótese base-topo de evolução da cascata de determinação sexual, proposta por Wilkins (1995);
- O gene *transformer-2* apresenta o menor grau de pleiotropia apesar de ser o gene mais conservado; essa relação ainda precisa ser investigada;
- As proteínas Tra e Tra2 materna são fundamentais para o desenvolvimento do fenótipo feminino em etapas iniciais do desenvolvimento embrionário;
- Os resultados indicam que alterações na expressão desses genes potencialmente podem ser utilizadas em estratégias de controle populacional.

Resumo

As moscas-das-frutas (Tephritidae) são pragas da fruticultura mundial cuja biologia é amplamente estudada. Um aspecto fundamental é sua determinação sexual. Esta se dá através da expressão sexo-específica dos genes *transformer*, *transformer*-2 e *doublesex*, que se organizam na forma de uma cascata de controle genético. São conhecidos uma série de efeitos relacionados ao silenciamento desses genes, como alterações do fenótipo sexual, no desenvolvimento das gônadas, redução da fecundidade e alterações comportamentais. Entretanto nenhum trabalho que compare os diferentes níveis dessa cascata de forma experimental foi feito até o momento. Este estudo poderia prover evidências sobre como se deu a diversificação dessa cascata ao longo da evolução. Existem duas hipóteses principais: a primeira (a) propõe que genes da base seriam mais pleiotrópicos e por isso mais conservados; enquanto a outra (b) propõe que os genes do topo seriam mais conservados, pois mutações nesses genes teriam maior custo adaptativo. Neste estudo pretendeu-se testar essas hipóteses apresentadas comparando os efeitos do silenciamento dos genes *transformer*, *transformer*-2 e *doublesex* em características reprodutivas de *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus*. Os indivíduos foram tratados com dsRNA dos genes de determinação sexual e foram testados quanto a: (a) fertilidade e fecundidade (fêmeas), (b) tamanho dos ovos produzido, (c) morfologia de gônadas (machos e fêmeas) e (d) comportamento reprodutivo (machos e fêmeas), além de testar a possibilidade de efeito materno. Os resultados indicam maior grau de pleiotropia no gene presente na base da cascata de determinação sexual (*doublesex*), o que estaria de acordo com a hipótese base-topo. Além disso, os resultados indicam que alterações na expressão desses genes têm o potencial de serem utilizadas em estratégias de controle populacional desse inseto-praga.

Abstract

Fruit flies (Tephritidae) are worldwide fruticulture pests, and their biology is widely studied. A key aspect is their sex determination. This occurs through the sex-specific expression of the *transformer*, *transformer-2* and *doublesex* genes, which are organized in a genetic control cascade. Several effects related to the silencing of these genes are known, such as changes in the sexual phenotype, on the development of the gonads, reduction in fertility besides behavioral changes. However, there is no study that compares the different levels of this cascade in an experimental approach. This study could provide evidence on how this cascade diversified throughout evolution. There are two main hypotheses: the first (a) proposes that base genes would be more conserved due to greater level of pleiotropy; while the other (b) proposes that the genes at the top would be more conserved, since mutations would have a higher adaptive cost. This study aimed to test these hypotheses presented by comparing the effects of silencing the *transformer*, *transformer-2* and *doublesex* genes on reproductive traits of *Anastrepha* sp.1 aff. *fraterculus*. Individuals were treated with dsRNA from sex determination genes and were tested for: (a) fertility and fecundity (females), (b) size of eggs, (c) gonad morphology (males and females) and (d) reproductive behavior (males and females), as well as testing the possibility of maternal effect. The results indicate greater levels of pleiotropy in the gene present at the base of the sex determination cascade (*doublesex*), which is in line with bottom-up hypothesis. Furthermore, the results indicate that alterations in the expression of these genes have the potential to be used in population control strategies for this insect pest.

Referências Bibliográficas

Abraham, S., Rull, J., Mendoza, M., Liendo, M.C., Devescovi, F., Koriz, A.K., Kovaleski, A., Segura, D.F. & Vera, M.T. (2014). Differences in sperm storage and remating propensity between adult females of two morphotypes of the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex. *Bulletin of Entomological Research*, *104*, 376-382.

Artieri, C. G., Haerty, W. & Singh, R. S. (2009). Ontogeny and phylogeny: molecular signatures of selection, constraint, and temporal pleiotropy in the development of *Drosophila*. *BMC biology*, *7*, 42.

Boller, E. F. (1968). An artificial oviposition device for the european cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi*. *Journal of Economic Entomology*, *61*, 850-852.

Brízóva, R., Mendonça, A.L., Vanícková, L., Mendonça, A.L., Da Silva, C.E., Tomcala, A., Paranhos, B.A.J., Dias, V.S., Joachim-Bravo, I.S., Hoskovec, M., Kalinová B. & Nacimento, R.R. (2013). Pheromone analyses of the Anastrepha fraterculus (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex. Florida Entomologist, 96, 1107-1115.

Burtis, K.C. & Baker, B.S. (1989). *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell*, *56*, 997-1010.

Chen, S. L., Dai, S. M., Lu, K. H. & Chang, C. (2008). Female-specific *doublesex* dsRNA interrupts *yolk* protein gene expression and reproductive ability in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Insect biochemistry and molecular biology*, *38*(2), 155-165.

Devescovi, F., Abraham, S., Roriz, A.K.P., Nolazco, N., Castañeda, R., Tadeo, E., Caceres, C., Segura, D.F., Vera, M.T., Joachim-Bravo, I., Canal, N. & Rull, J. (2014). Ongoing speciation within the *Anastrepha fraterculus* cryptic

species complex: the case of the andean morphotype. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *152*, 238–247.

Diaz, F., Lima, A. L. A., Nakamura, A. M., Fernandes, F., Sobrinho Jr, I. & De Brito, R. A. (2018). Evidence for introgression among three species of the Anastrepha fraterculus group, a radiating species complex of fruit flies. *Frontiers in Genetics*, *9*, 359.

Eirín-López, J. M. & Sánchez, L. (2015). The comparative study of five sex-determining proteins across insects unveils high rates of evolution at basal components of the sex determination cascade. *Development genes and evolution*, *225*, 23-30.

Gempe, T. & Beye M. (2011). Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. *Bioessays*, *33*, 52–60.

Häcker, I., & Schetelig, M. F. (2021). Genome editing for insect pest control: curse or blessing? In J. Hendrichs, R. Pereira, & M. J. B. Vreysen (Eds.), Area Wide Integrated Pest Management: Development and Field Application (pp. 824-842). Taylor & Francis Group.

Hedley, M. & Maniatis, T. (1991). Sex-specific splicing and polyadenylation pf *dsx* pre-mRNA requires a sequence that binds specifically to Tra-2 protein *in vitro*. *Cell*, *65*, 579-586.

Hernandez-Ortiz, V., Gómez-Anaya, J.A., Sánchez, A., McPheron, B.A. & Aluja, M. (2004). Morphometric analysis of mexican and south american populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) and recognition of a distinct mexican morphotype. *Bulletin of Entomological Research*, *94*, 487-499.

Hernandez-Ortiz, V., Bartolucci, A., Morales-Valles, P., Frías, D. & Selivon, D. (2012). Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae): a multivariate approach for the recognition of south american morphotypes. *Annals of Entomological Society of America*, *105*, 305-318.

Hernández-Ortiz, V., Canal, N.A., Salas, J.O.T., Ruíz-Hurtado, F.M. & Dzul-Cauich, J.D. (2015). Taxonomy and phenotypic relationships of the *Anastrepha fraterculus* complex in the mesoamerican and pacific Neotropical dominions (Diptera, Tephritidae). *Zookeys*, *540*, 95.

Hertel, K.J., Lynch, K.W., Hsiao, E.C., Liu, E.H. & Maniatis, T. (1996). Structural and functional conservation of the *Drosophila doublesex* splicing enhancer repeat elements. *Rna*, *2*, 969-98.

Hoshijima, K., Inoue, K., Higuchi, I, Sakamoto, H. & Shimura, Y. (1991). Control of *doublesex* alternative splicing by *transformer* and *transformer-2* in *Drosophila*. *Science*, *252*, 833-836.

Liu, G., Wu, Q., Li, J., Zhang, G. & Wan, F. (2015). RNAi-mediated knock-down of *transformer* and *transformer-2* to generate male-only progeny in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Plos One*, *10*, e0128892.

Lopes, G. N., Arias, O.R., Cônsoli, F.L. & Zucchi, R.A. (2013). The identity of specimens of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae) with atypical aculeus tip. *Neotropical Entomology*, *42*, 618-627.

Machota, R., Bortoli, L. C., Cavalcanti, F. R., Botton, M., & Grützmacher, A. D. (2016). Assessment of injuries caused by *Anastrepha fraterculus* (Wied.)(Diptera: Tephritidae) on the incidence of bunch rot diseases in table grape. *Neotropical entomology*, *45*(4), 361-368.618-627, 2013.

Marın, I., & Baker, B. S. (1998). The evolutionary dynamics of sex determination. *Science*, *281*(5385), 1990-1994.

McRobert, S. P., & Tompkins, L. (1985). The effect of *transformer*, *doublesex* and *intersex* mutations on the sexual behavior of *Drosophila* melanogaster. *Genetics*, *111*, 89-96.

Meccariello A, Salvemini M, Primo P, Hall B et al. (2019) *Maleness-on-the-Y* (*MoY*) orchestrates male sex determination in major agricultural fruit fly pests. *Science 365* (6460): 1457-1460.

Morrow, J. L., Riegler, M., Frommer, M., & Shearman, D. C. A. (2014). Expression patterns of sex-determination genes in single male and female embryos of two *Bactrocera* fruit fly species during early development. *Insect Molecular Biology*, *23*, 754-767.

Oroño, L., Paulin, L., Alberti, A.C., Hilal, M., Ovruski, S., Vilardi, J.C., Rull, J. & Aluja, M. (2013). Effect of host plant chemistry on genetic differentiation and reduction of gene flow among *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) populations exploiting sympatric, synchronic hosts. *Environmental Entomology*,*42*, 790-798.

Pane A, Salvemini M, Delli Bovi P, Polito LC, Saccone G (2002) The *transformer* gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development 129*: 3715-3725.

Passra, H., Veerana, M., & Ngernsiri, L. Double strand RNA of female *doublesex* gene effects the ovary development in rice moth, *Corcyra cephalonica*. *26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and Internatcional Conference*, 2014.

Peng, W., Zheng, W., Handler, A. M., & Zhang, H. (2015). The role of the *transformer* gene in sex determination and reproduction in the tephritid fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Genetica*, *143*, 717-727.

Pomiankowski, A., Nöthiger, R., & Wilkins, A. (2004). The evolution of the *Drosophila* sex-determination pathway. *Genetics*, *166*, 1761-1773.

Prezotto, L. (2008). *Análise do ITS1 do DNA ribossomal em espécies do complexo Anastrepha fraterculus*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo.

Rendón, P., & Enkerlin, W. (2021). Area-wide fruit fly programmes in Latin America. In J. Hendrichs, R. Pereira, & M. J. B. Vreysen (Eds.), Area wide integrated Pest management: Development and field application (pp. 161-196).

Rezende, V. B., Congrains, C., Lima, A. L. A., Campanini, E. B., Nakamura, A. M., Oliveira, J. L., Chahad-Ehlers, S., Sobrinho, I. & Brito, R. A. (2016). Head transcriptomes of two closely related species of fruit flies of the Anastrepha fraterculus group reveals divergent genes in species with extensive gene flow. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, g3-116.

Rideout, E. J., Dornan, A. J., Neville, M. C., Eadie, S., & Goodwin, S. F. (2010). Control of sexual differentiation and behavior by the *doublesex* gene in *Drosophila melanogaster*. *Nature neuroscience*, *13*, 458.

Ruiz, M. F., Stefani, R. N., Mascarenhas, R. O., Perondini, A. L., Selivon, D., & Sánchez, L. (2005). The gene *doublesex* of the fruit fly *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). *Genetics*.

Ruiz, M. F., Eirín-López, J. M., Stefani, R. N., Perondini, A. L., Selivon, D., & Sánchez, L. (2007). The gene *doublesex* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *Development genes and evolution*, *217* 725-731.

Ruiz, M. F., Milano, A., Salevmini, M., Eirin-López, J.M., Perondini, A.L.P., Selivon, D., Polito, C., Saccone, G. & Sánchez, L. (2007). The Gene transformer of Anastrepha fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. Plos One, 2(11), E1239. 2007.

Rull, J., Abraham, S., Kovaleski, A., Segura, D.F., Islam, A., Wornoyaporn, V., Dammalage, T., Santo Tomas, U. & Vera, M.T. (2012). Random mating and reproductive compatibility among argentinean and southern brazilian populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Bulletin of Entomological Research*, *102*, 435-443.

Rull, J., Abraham, S., Kovaleski, A., Segura, D.F., Mendoza, M., Liendo, M.C. & Vera, M.T. (2012). Evolution of pre-zygotic and post-zygotic barriers to gene flow among three cryptic species within the *Anastrepha fraterculus* complex. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *148*, 213–222.

Ryner, L.C. & Baker, B.S. (1991) Regulation of *doublesex* pre-mRNA processing occurs by 3'-splice site activation. *Genes Development*, 5, 2071-2085.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sarno, F., Ruiz M.F., Eirin-López, J.M., Perondini, A.L.P., Selivon, D. & Sánchez, L. (2010). The gene *transformer-2* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *BMC Evolutionary Biology 10*, 140.

Schetelig, M.F., Milano, A., Saccone, G. & Handler, A.M. (2012) Male only progeny in *Anastrepha suspensa* by RNAi-induced sex reversion of chromosomal females. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *42*, 51-57.

Schutt, C., & Nothiger, R. (2000). Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development*, *127*, 667-677.

Segura, D., Petit-Marty, N., Sciurano, R., Vera, T., Calcagno, G., Allinghi, A., & Vilardi, J. (2007). Lekking behavior of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, *90*, 154-162.

Selivon, D. (1996). *Estudo sobre a diferenciação populacional em Anastrepha fraterculus (Wiedemann) (Diptera, Tephritidae)*. Tese de Doutorado, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Selivon, D. & Perondini, A.L.P. (1998). Eggshell morphology in two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Annals of Entomological Society of America*, *91*, 473-478.

Selivon, D.; Perondini, A.L.P. & Morgante, J.S. (1999). Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Genetics and Molecular Biology*, *22*, 507–510.

Selivon, D.; Perondini, A.L.P. & Morgante, J.S. (2005). A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex

(Diptera, Tephritidae). *Annals of Entomological Society of America*, *98*, 367-381.

Stearns, F. W. (2010). One hundred years of pleiotropy: a retrospective. *Genetics*, *186*, 767-773.

Sutton, B. D., Steck, G.J., Norrbom, A.L., Rodriguez, E.J., Srivastava, P., Alvarado, N.N., Colque, F., Land, E.Y., Sánchez, J.J.L., Quisberth, E., Peñarada, E.A., Clavijo, P.A.R., Alvarez-Baca, J.K., Zapata, T.G. & Ponce, P. (2015). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) variation in the *Anastrepha fraterculus* cryptic species complex (Diptera, Tephritidae) of the Andean Region. *Zookeys*, *540*, 175.

Teixeira, I. L. A. (2017). *Silenciamento dos genes fruitless e period: efeitos no comportamento locomotor e reprodutivo de Anastrepha sp.1 affinis fraterculus (Diptera, Tephritidae)*. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. Doi:10.11606/T.41. 2018.Tde-02042018-113118.

Vera, M. T., Cáceres, C., Wornoayporn, V., Islam, A., Robinson, A. S., De La Vega, M. H., ... & Cayol, J. P. (2006). Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly Anastrepha fraterculus (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *99*, 387-397.

Verhulst, E. C., van de Zande, L. & Beukeboom, L. W. (2010). Insect sex determination: it all evolves around *transformer*. *Current opinion in genetics & development*, *20*, 376-383.

Vicari, P. E. (2016). Efeitos do silenciamento gênico de transformer-2 a partir da aplicação de RNAi parental em Anastrepha sp.1 affinis fraterculus (Diptera, Tephritidae). Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. doi:10.11606/D.41.2016.tde-20102016-164736.

Vicari, P.E., Chang, E. S., Perondini, A. L. P., Selivon D. (2021) Parental RNAi Silencing of the transformer-2 Gene in a Species of the *Anastrepha*

fraterculus Complex of Cryptic Species (Diptera, Tephritidae). *Journal of Agricultural Science*; 13 (10).

Waterbury, J. A., Jackson, L. L. & Schedl, P. (1999). Analysis of the doublesex female protein in *Drosophila melanogaster*: role in sexual differentiation and behavior and dependence on intersex. *Genetics*, *152*, 1653-1667.

Wilkins, A. S. (1995). Moving up the hierarchy: a hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. *Bioessays*, *17*, 71-77.

Willhoeft U, Franz G (1996) Identification of the Sex-Determining Region of the *Ceratitis capitata* Y Chromosome by Deletion Mapping. *Genetics* 144: 737-745