

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

LARISSA COSTA DE SOUZA

Silenciamento gênico por RNA interferente (RNAi) em traça-do-  
tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick): abordagens de entrega do dsRNA

Piracicaba

2022



LARISSA COSTA DE SOUZA

Silenciamento gênico por RNA interferente (RNAi) em traça-do-  
tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick): abordagens de entrega do dsRNA  
Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Área de Concentração: Biologia na Agricultura  
e Meio Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira  
Figueira

Piracicaba  
2022

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

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Souza, Larissa Costa de

Silenciamento gênico por RNA interferente (RNAi) em traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick): abordagens de entrega do dsRNA / Larissa Costa de Souza; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.  
67 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2022.

1. Insetos nocivos 2. Melhoramento genético vegetal 3. Plantas transgênicas  
4. Pragas de plantas 5. Tomate I. Título

CDU (631.52 : 632.7)

**Elaborada por:**

Marilia Ribeiro Garcia Henyei  
CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Dedico a dissertação a todos os familiares e amigos que sempre me apoiaram e ajudaram, e principalmente meus pais que sempre foram meu alicerce.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe de pesquisa, pela estrutura fornecida para a realização deste trabalho, pela confiança, correções e por ter me incentivado no desenvolvimento científico.

À Universidade de São Paulo, ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e aos professores que foram fundamentais para a minha formação.

Ao Dr. Eder Marques da Silva pelos ensinamentos, questionamentos e apoio na condução dos meus ensaios.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão de bolsa para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra e toda a sua equipe pela receptividade em seu Laboratório, auxiliando na condução dos meus experimentos.

À Dr. Flavia de Moura Manoel Bento pelas informações e auxílios ao meu estudo.

Aos parceiros de Laboratório, Albania Patiño, André Yuji, Angélica Vargas, Bárbara Gonçalves, Bruna Factor, Bruna Queiroz, Bruno Bachiega, Daniele Paschoal, Danielle Scotton, Gabriel Silvino, Gyanluca Martins, Hugo Corocher, João Mendes, Laecio Sampaio, Lorena Reis, Lucas Melotto, Luciana Chiba, Luis Serezino, Marília Morandi, Rafael Monteiro, Rafael Rosada, Rodolfo Maniero, Verusca Rossi e Vitor Ometto, pela amizade, apoio, conversas e conhecimentos transmitidos.

Aos companheiros de estudo de RNAi em *Tuta absoluta* e criação de inseto, Anieli Baldo e Leonardo Zimmermann pelo empenho e colaboração.

Aos técnicos de Laboratório Felipe Campana, Paulo Cassieri, Wlamir Godoy, funcionários dos Setores de Transporte e Manutenção, por todo auxílio na condução das minhas atividades.

Aos meus pais, Eduardo e Marcia, por todo amor, encorajamento, por acreditarem e apoiarem minhas escolhas, e a minha irmã, Fernanda, por toda força, orações e respeito.

A todos que de alguma forma contribuíram com meu trabalho.



## RESUMO

SOUZA, L. C. **Silenciamento gênico por RNA interferente (RNAi) em traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick):** abordagens de entrega do dsRNA. 2022. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.

A Traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* Meyrick 1917 (Lepidoptera: Gelechiidae), é uma das pragas de maior importância econômica do tomateiro. O inseto pode causar perdas de 80 a 100% na produção de tomate por meio do consumo dos tecidos do mesófilo foliar das plantas, causando redução da capacidade fotossintética e da biomassa vegetal. Devido ao uso repetitivo e excessivo de inseticidas sem a devida rotação dos princípios ativos, associado ao alto número de gerações da praga durante o ciclo do tomateiro, há o potencial surgimento de populações resistentes de *T. absoluta* aos inseticidas, sendo necessárias novas tecnologias para controle desta praga. O RNA interferente (RNAi) consiste em um mecanismo de silenciamento gênico que envolve o fornecimento de moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA) homólogas a uma sequência específica de gene alvo essencial da praga que leva ao silenciamento da expressão deste. A entrega da tecnologia de RNAi em campo pode ser via geração de plantas que produzam o dsRNA via transgenia ou a produção de moléculas de dsRNA para aplicar diretamente na planta e no inseto como um inseticida, sendo necessário estudos para avaliar a forma eficiente de entrega de RNAi contra os insetos praga e seu potencial de controle. Com isso, neste estudo foi analisada a entrega de dsRNA para o controle de *T. absoluta* via plantas transgênicas e por dsRNA sintético absorvidos em folíolos de tomateiro destacados. Nas duas formas de entrega, foram utilizadas as mesmas regiões dos mesmos genes alvos, sendo o que codifica a subunidade A da ATPase vacuolar (*V-ATPase A*) e a Arginina quinase (*AK*). Na primeira etapa do trabalho foi possível otimizar um método de entrega das plantas de tomateiro cv. Micro-Tom para lagartas de *T. absoluta*, que permitiu uma avaliação precisa do dano foliar e permitiu o desenvolvimento normal do inseto. O método testou três densidades de lagartas expostas para se alimentar nos folíolos do tomateiro, e foi avaliado a área de lesão, duração e viabilidade das fases de lagarta, pupa e adulto. O melhor resultado obtido de acordo com os parâmetros avaliados foi o de densidade de 3 lagartas recém eclodidas, sendo colocada uma lagarta por folíolo, podendo mantê-las por 12 dias até completar seu ciclo larval normal, permitindo avaliar o dano foliar. Posteriormente, foram realizados ensaios com a entrega de tomateiro cv. Micro-Tom transgênicos empregando a metodologia anterior. Os eventos transgênicos foram selecionados após a confirmação da transgenia na geração de plantas T<sub>3</sub> pela amplificação de fragmento por reação em cadeia da polimerase (PCR) e pelo nível de expressão dos transgenes pela amplificação quantitativa de transcritos reverso (RT-qPCR). Entre os oito eventos *V-ATPase-A* e cinco *AK*, foram escolhidos quatro *V-ATPase* e três *AK*. Os ensaios de entrega dos eventos transgênicos permitiram detectar a diminuição significativa da herbivoria para os eventos *AK3* e *VATPase 4.1* e o silenciamento dos genes alvos da *T. absoluta* quando alimentadas dos eventos *AK3*

e V-ATPase 1.2. Para os ensaios conduzidos de entrega de moléculas de dsRNA sintéticas por meio em folíolos destacados de tomateiro cv. Santa Clara que absorveram o dsRNA via pecíolo houve redução significativamente da herbivoria de *T. absoluta* nos folíolos tratados com 2 e 4 µg de dsRNA com sequências do gene *AK* e nos tratamentos com 1 e 4 µg de dsRNA com sequências do gene *V-ATPase A* em relação ao controle com água. Em conclusão, este trabalho desenvolveu uma metodologia eficiente para entrega de dsRNA em tomateiro cv. Micro-Tom e detectou a redução da herbivoria e silenciamento gênico de *T. absoluta* quando lagartas se alimentaram dos eventos transgênicos de RNAi para o gene *AK* e *V-ATPase A*. Também demonstrou menor herbivoria de *T. absoluta* com a entrega de dsRNA sintetizados in vitro para os genes alvos *AK* e *V-ATPase A*.

Palavras-chave: RNAi. *Tuta absoluta*. Entregas de dsRNA. Silenciamento gênico.

## ABSTRACT

SOUZA, L. C. **Gene silencing by RNA interference (RNAi) in the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta* (Meyrick): dsRNA delivery approaches.** 2022. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.

The South American tomato pinworm, *Tuta absoluta* Meyrick 1917 (Lepidoptera: Gelechiidae), is one of the most economically important pests of tomato. The insect can cause 80 to 100% losses in tomato production through consumption of plant leaf mesophyll tissues, causing a reduction in photosynthetic capacity and plant biomass. Due to the repetitive and excessive use of insecticides without proper rotation of the active ingredients, associated with the high number of generations of the pest during the tomato cycle, there is the potential emergence of resistant populations of *T. absoluta* to insecticides, requiring new technologies to control it. of this plague. Interfering RNA (RNAi) consists of a gene silencing mechanism that involves the supply of double-stranded RNA (dsRNA) molecules homologous to a specific sequence of an essential target gene of the pest that leads to the silencing of its expression. The delivery of RNAi technology in the field can be via the generation of plants that produce the dsRNA via transgenics or the production of dsRNA molecules to apply directly to the plant and insect as an insecticide, requiring studies to evaluate the efficient way of delivery of dsRNA. RNAi against insect pests and their control potential. Thus, in this study, the delivery of dsRNA for the control of *T. absoluta* via transgenic plants and by synthetic dsRNA absorbed in detached tomato leaflets was analyzed. In both forms of delivery, the same regions of the same target genes were used, the one encoding the A subunit of vacuolar ATPase (*V-ATPase A*) and Arginine kinase (*AK*). In the first stage of the work, it was possible to optimize a method of delivery of tomato plants cv. Micro-Tom for *T. absoluta* caterpillars, which allowed an accurate assessment of leaf damage and allowed normal insect development. The method tested three densities of caterpillars exposed to feed on tomato leaflets, and the lesion area, duration and viability of the caterpillar, pupal and adult stages were evaluated. The best result obtained according to the evaluated parameters was the density of 3 newly hatched caterpillars, with one caterpillar per leaflet, being able to keep them for 12 days until they complete their normal larval cycle, allowing to evaluate the leaf damage. Subsequently, tests were carried out with the delivery of tomato cv. Micro-Tom transgenics using the previous methodology. The transgenic events were selected after the confirmation of transgenesis in the generation of T3 plants by the amplification of fragments by polymerase chain reaction (PCR) and by the level of expression of the transgenes by quantitative amplification of reverse transcripts (RT-qPCR). Among the eight *V-ATPase-A* and five *AK* events, four *V-ATPase* and three *AK* events were chosen. The transgenic event delivery assays allowed to detect a significant decrease in herbivory for *AK3* and *VATPase 4.1* events and the silencing of *T. absoluta* target genes when fed on *AK3* and *VATPase 1.2* events. For the delivery assays of synthetic dsRNA molecules through medium in detached leaflets of tomato

cv. Santa Clara that absorbed dsRNA via petiole, there was a significant reduction in the herbivory of *T. absoluta* in leaflets treated with 2 and 4 µg of dsRNA with *AK* gene sequences and in treatments with 1 and 4 µg of dsRNA with *V-ATPase A* gene sequences in compared to water control. In conclusion, this work developed an efficient methodology for the delivery of tomato cv. Micro-Tom e detected the reduction of herbivory and gene silencing of *T. absoluta* when caterpillars fed on the transgenic events of RNAi for gene *AK* and *V-ATPase A*. It also showed lower herbivory of *T. absoluta* with the delivery of dsRNA synthesized in vitro for the target genes *AK* and *V-ATPase A*.

Keywords: RNAi. *Tuta absoluta*. dsRNA deliveries. Gene silencing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da <i>Tuta absoluta</i> no mundo.....	20
Figura 2 - Ciclo biológico da <i>Tuta absoluta</i> .....	22
Figura 3 - Criação de <i>Tuta absoluta</i> .....	34
Figura 4 - Representação da metodologia usada para transferência de três lagartas por folha .....	36
Figura 5 - Representação da metodologia utilizada no ensaio de entrega de dsRNA sintético absorvidos por folíolos de tomate Santa Clara.....	42
Figura 6 - Representação da evolução do dano foliar causado pela fase larval de <i>Tuta absoluta</i> , nas densidades de 3, 6 e 9 lagartas por folha aos 5, 7 e 9 dias após início da alimentação.....	47
Figura 7 - Produtos de amplificação de fragmentos de 190pb do gene da Arginina quinase ( <i>AK</i> ) .....	49
Figura 8 - Produtos de amplificação de fragmentos de 139pb do gene da subunidade A da ATPase vacuolar ( <i>V-ATPase A</i> ) .....	50
Figura 9 - Expressão relativa do gene <i>AK</i> em plantas de Micro-Tom transgênicas .....	51
Figura 10 - Expressão relativa do gene <i>V-ATPase A</i> em plantas de Micro-Tom transgênicas .....	51
Figura 11 - Resultados dos diferentes parâmetros biológicos e dano nos ensaios de alimentação de <i>Tuta absoluta</i> em eventos transgênicos <i>AK</i> .....	53
Figura 12 - Resultados dos diferentes parâmetros biológicos e dano nos ensaios de alimentação de <i>Tuta absoluta</i> em eventos transgênicos <i>V-ATPase A</i> .....	55
Figura 13 – Expressão relativa dos gene alvos <i>V-ATPase A</i> e <i>AK</i> em larvas de <i>Tuta absoluta</i> (n=20) após alimentação por 2, 4 e 6 dias em plantas transgênicas de RNAi para o gene <i>V-ATPase A</i> e <i>AK</i> .....	57
Figura 14 - Qualidade do dsRNA <i>V-ATPase A</i> (2), GFP (3) e <i>AK</i> (4).....	58
Figura 15 – Resultados de área foliar consumida por lagartas de <i>Tuta absoluta</i> em folíolos de tomate Santa Clara que absorveram diferentes doses de dsRNA de <i>V-ATPase A</i> , <i>AK</i> e controle dsRNA-GFP e água .....	60



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1	<i>Tuta absoluta</i> .....	18
2.2	RNAi: Mecanismo do silenciamento gênico por RNA interferente (RNAi) .....	22
2.3	Captação, transferência e amplificação do dsRNA nas células .....	25
2.4	Métodos de entrega de dsRNA aos insetos.....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
3.1	Criação da Traça-do-tomateiro ( <i>Tuta absoluta</i> ).....	32
3.2	Material vegetal .....	33
3.3	Otimização de ensaio com plantas de tomateiro Micro-tom .....	33
3.4	Extração de DNA e análise por PCR das linhagens transgênicas .....	34
3.5	Extração de RNA para a síntese de cDNA e confirmação da expressão das linhagens transgênicas por amplificação quantitativa de transcritos reverso (RT-qPCR).....	35
3.6	Ensaio de Dano foliar com tomateiro Micro-Tom transgênico.....	36
3.7	Ensaio de silenciamento gênico com tomateiro Micro-Tom transgênico .....	36
3.8	Extração de RNA e síntese de cDNA das amostras de <i>T. absoluta</i> para análise de expressão por RT-qPCR .....	37
3.9	Síntese de dsRNA sintético e entrega para lagartas de <i>Tuta absoluta</i> .....	38
3.10	Análise estatística.....	39

<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Otimização de ensaio com plantas de tomateiro Micro-tom .....</b>	<b>40</b>
4.1.1	Fase Larval .....	40
4.1.2	Fase de pupa e adulto .....	41
4.1.3	Viabilidade das fases de <i>T. absoluta</i> .....	42
4.1.4	Dano foliar.....	42
<b>4.2</b>	<b>Ensaio de alimentação com tomateiro Micro-Tom transgênico .....</b>	<b>44</b>
4.2.1	Caracterização molecular dos eventos transgênicos.....	45
4.2.2	Alimentação da <i>T. absoluta</i> nos eventos transgênicos .....	48
4.2.3	Ensaio de silenciamento gênico .....	52
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A agricultura tem importância primordial para a humanidade, visto que os produtos de origem vegetal são utilizados para inúmeros fins, desde para o consumo humano e animal, como também para aplicações modernas, como na produção de biocombustíveis, energia elétrica e medicamentos (BOLFE et al., 2018). Embora o setor agrícola esteja se modernizando com objetivo de atingir maiores índices de produção agrícola, seja pela automatização das atividades no campo ou pela adoção das boas práticas agrícolas e da biotecnologia, a baixa produtividade agrícola por fatores climáticos e ocorrências de pragas e doenças é uma preocupação (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura - FAO et al., 2021).

O tomate (*Solanum lycopersicon L.*), originário da América do Sul, é cultivado em mais de 175 países e ocupa a oitava colocação no ranking agrícola global, representando R\$ 58 bilhões de dólares no mercado mundial (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2019). No Brasil, a produção de tomate possui grande relevância, já que o país é o nono maior produtor no mundo, arrecadando cerca de R\$ 6,04 bilhões ao setor agrícola (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2021). Em 2020, aproximadamente 55,6 mil hectares de tomate foram cultivados, produzindo cerca de 3,9 milhões de toneladas do fruto, sendo os estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais os maiores produtores (IBGE, 2021).

A produção sustentável de tomate em condições de clima tropical, é um grande desafio devido ao rápido surgimento e crescimento de várias pragas e doenças. Algumas pragas são objeto de grande preocupação na cultura do tomate por apresentarem alta incidência, como a *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), conhecida popularmente como a traça-do-tomateiro (PEDROSO, 2020), podendo causar entre 80 e 100% de perdas no rendimento da produção agrícola comercial de tomate (DESNEUX et al., 2010; GUILLEMAUD et al., 2015). Descrita como uma espécie nativa da América do Sul, a *T. absoluta* se tornou importante ameaça à produção mundial devido ao seu rápido desenvolvimento e rápida dispersão e adaptação a novas áreas (TONNANG et al., 2015; URBANEJA et al., 2013).

As estratégias de manejo para o controle da *T. absoluta* incluem táticas de controle cultural, varietal e biológico (BOTTEGA et al., 2017; KAOUD, 2014; CAPARROS MEGIDO; HAUBRUGE; VERHEGGEN, 2013; ZAPPALÀ et al., 2012). A principal estratégia de controle adotada no Brasil é o controle químico (DESNEUX et al., 2010; LATORRACA; SOUSA; FORNÉS, 2008). No entanto, a eficácia do controle químico apresenta sérias limitações. O número excessivo de pulverizações e a ausência da rotação dos princípios ativos dos inseticidas aumentam a pressão de seleção sobre a praga, acarretando o surgimento de populações resistentes aos inseticidas (HADDI et al., 2012; SILVA et al., 2016). Combinado a isso, o hábito minador da praga e arquitetura da planta são fatores que também dificultam a ação dos inseticidas sobre a praga-alvo, gerando falhas de controle no campo (GUEDES et al., 2019).

Neste contexto, alternativas sustentáveis e ambientalmente responsáveis para controlar insetos pragas nos cultivos agrícolas são essenciais. A descoberta e compreensão de um mecanismo de ação por RNA de interferência (RNAi), altamente conservado em organismos eucariotos, apresenta potencial no controle de insetos pragas, levando a alterações no desenvolvimento do inseto, perda do apetite, infertilidade ou até morte (HUVENNE; SMAGGHE, 2010), reduzindo o impacto do ataque na produção de alimentos.

RNAi é um mecanismo de regulação gênica que atua em nível pós-transcricional (PTGS - *post-transcriptional gene silencing*), desencadeado por uma molécula de RNA dupla fita (dsRNA) com sequências de nucleotídeos homólogas a um gene-alvo (MEISTER; TUSCHL, 2004). O controle da expressão gênica ocorre com a clivagem do RNA mensageiro-alvo (mRNA) no citoplasma, impedindo a sua tradução e interferindo na síntese e acúmulo de proteínas (CHICAS; MACINO, 2001). Essa técnica de silenciamento gênico possibilita o estudo e descoberta das funções de genes, bem como aplicações na agricultura (BELLÉS, 2010; ZHANG et al., 2017; ZHAO et al., 2011).

Para o controle de insetos, diversas abordagens de RNAi tem sido analisadas, demonstrando o potencial do silenciamento em insetos através da entrega de dsRNA via injeção direta em organismos alvo (ARAKANE et al., 2005; TOMOYASU et al., 2008); por meio de plantas transgênicas expressando dsRNAs (BAUM et al., 2007; PRICE; GATEHOUSE, 2008; ZHANG et al., 2017); por meio de organismos modificados, como vírus e bactérias, para expressar dsRNA (BENTO et al., 2019; GU

et al., 2011; TIAN et al., 2009); pela entrega de dsRNA via dieta artificial ou natural ou a entrega direta via pulverização de dsRNA em superfície foliar, ou mesmo sobre o inseto. (SCOTT et al., 2013). A eficácia do mecanismo de RNAi pode variar dependendo do modo de entrega, espécie-alvo, genes-alvo, tecido, quantidade e comprimento da molécula de dsRNA fornecida (HUVENNE; SMAGGHE, 2010; TERENIUS et al., 2011). Aliado ao uso do RNAi para o controle de insetos, a produção comercial de moléculas de dsRNA sintéticas avançam e apresentam queda de custos, se tornando uma opção competitiva para fornecimento de dsRNAs, visando uma alternativa mais barata e eficiente no manejo de insetos-pragas (RODRIGUES et al., 2021).

O potencial de silenciamento gênico por RNAi em *Tuta absoluta* foi demonstrado por meio da absorção da solução de dsRNA por folíolos destacados de tomate e expressão transiente após agroinfiltração foliar, provocando o silenciamento dos genes alvos da subunidade A catalítica vacuolar ATPase (*V-ATPase A*) e a arginina quinase (*AK*) (CAMARGO et al., 2016). Plantas transgênicas expressando dsRNAs homólogos a regiões dos genes *V-ATPase* e *AK* também foram capazes de afetar o desenvolvimento da *T. absoluta* e silenciar a expressão dos genes alvos no inseto (CAMARGO et al., 2016). O fornecimento de *Escherichia coli* HT115 (DE3) expressando dsRNA em dieta artificial também causou o silenciamento do gene *AK* e aumento na mortalidade larval de *T. absoluta* (BENTO et al., 2020).

A partir desse contexto, o presente estudo obteve gerações avançadas em homozigose de eventos transgênicos expressando dsRNA de genes-alvo de *T. absoluta* gerados por Camargo et al. (2016). Os eventos transgênicos foram caracterizados molecularmente, para posteriormente avaliação do efeito da expressão de fragmento de dsRNAs *AK* e *V-ATPase A* sob investigando diversos parâmetros biológicos relacionados ao desenvolvimento e dano provocado pela *Tuta absoluta*. Para tal, foi testado o número suficiente de lagartas por folha que permitisse a alimentação e sobrevivência dos indivíduos até o final do ciclo de vida, analisando os resultados de duração das fases larval, pupal e adulto, viabilidade larval e pupal, e dano ou área foliar consumida. Além disso, foi avaliado o efeito nas lagartas de *T. absoluta* da alimentação após a entrega de moléculas de dsRNA sintéticas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Tuta absoluta*

A traça-do-tomateiro foi primeiramente descrita como *Phthorimaea absoluta* (Meyrick 1917) coletada em Huancayo, Peru. O nome do gênero foi alterado três vezes, para *Gnorimoschema absoluta* (1962), *Scrobipalpula absoluta* (1964), *Scrobipalpuloides absoluta* (1987), e por fim nomeada de *Tuta absoluta* (Povolny, 1994). A *T. absoluta* é um microlepidóptero minador pertence à ordem Lepidoptera, subordem Ditrysia, superfamília Gelechioidea, família Gelechiidae e subfamília Gelechiinae (MICHEREFF FILHO; GUIMARAES; MOURA, 2013).

A *T. absoluta* teve sua origem na América do Sul, especificamente na região do Chile (GUILLEMAUD et al., 2015). As populações de *T. absoluta* eram restritas a América do Sul até meados de 2006, quando foi detectada inicialmente na Espanha e espalhou-se rapidamente pelo sul da Europa e, posteriormente, pelo norte da África. Atualmente, a *T. absoluta* está presente em todos os países do Mediterrâneo (DESNEUX et al., 2010), possuindo ampla dispersão e alto potencial reprodutivo nas regiões, possuindo a capacidade de se desenvolver em uma ampla faixa de temperaturas entre 10 e 30°C (BARRIENTOS et al., 1998; KRECHEMER; FOERSTER, 2015) (Figura 1).

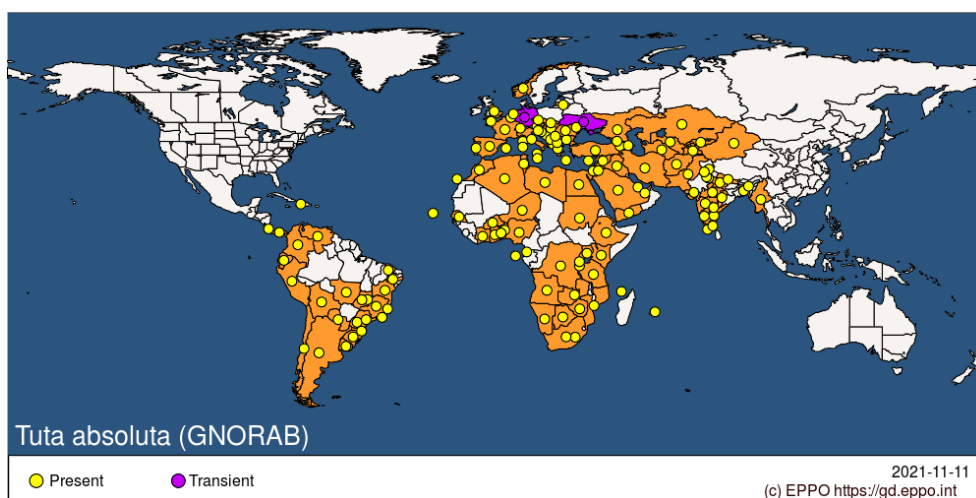


Figura 1 – Distribuição geográfica da *Tuta absoluta* no mundo (EPPO, 2021)

Os hospedeiros da traça-do-tomateiro são as plantas da família Solanaceae, sendo o tomateiro o principal hospedeiro. Pode sobreviver em outras solanáceas, como batata (*S. tuberosum*), berinjela (*S. melongena*) e *S. gracilius* (GALARZA, 1984), e em espécies selvagens do gênero *Solanum*, *Datura* e *Nicotiana* (CIFUENTES; CHYNOWETH; BIELZA, 2011).

No tomateiro (*Solanum lycopersicum*), o ciclo de vida da *T. absoluta* em média é de 22 dias em temperaturas variando entre 25 e 27°C, podendo oscilar de 22 a 73 dias dependendo das condições ambientais (BARRIENTOS et al., 1998; URBANEJA et al., 2013). Considerada uma espécie multivoltina, pode apresentar 10 a 12 gerações por ano, e no Estado de São Paulo estima-se a ocorrência de 6 a 9 gerações por ano (MIHSFELDT, 1998). O ciclo de vida da *T. absoluta* compreende quatro estágios de desenvolvimento, ovo, larva, pupa e adulto, sendo considerada um inseto holometábolo por apresentar metamorfose completa (SANDA et al., 2018) (Figura 2). Em sua fase adulta, *T. absoluta* é uma mariposa pequena de 10 a 11 mm de comprimento, com hábitos crepuscular-noturno-auroral, e apresenta coloração cinza-prateada, antenas filiformes e palpos labiais recurvados (URBANEJA et al., 2013).

A longevidade dos adultos em média é de 10 dias, podendo variar em função da temperatura, do tipo de alimento da fase larval e do sexo. Os machos emergem antes que as fêmeas, e o acasalamento ocorre logo após a emergência dos adultos. As fêmeas fecundadas possuem o hábito de ovopositar individualmente ao longo das nervuras dos folíolos, na superfície superior e inferior das folhas. Podem também depositar seus ovos em brotos, hastes, no cálice das folhas e nos frutos (DESNEUX et al., 2010; URBANEJA et al., 2013). As fêmeas têm alta capacidade reprodutiva, ovipositando cerca de 260 a 300 ovos durante seu ciclo de vida, e 76% dos ovos são depositados na primeira postura (BOGORNÍ; CARVALHO, 2006; MIHSFELDT, 1998; SANDA et al., 2018). Os ovos são elípticos, pequenos (0,36 mm x 0,22 mm), e variam de branco cremoso a amarelo brilhante (SANDA et al., 2018).

A fase juvenil inicia após a eclosão das lagartas, 4 a 6 dias após a oviposição em condições de temperaturas entre 20 e 25°C (NEGI et al., 2020). A fase de lagarta, em condições controladas de temperatura e umidade (25±1°C; 65±10% UR), pode variar de 13 a 15 dias, e consiste em 4 instares, bem definidos em tamanho e cor (BOGORNÍ; CARVALHO, 2006; DE CASSIA; COELHO; FRANCA, 1987). O primeiro instar larval é caracterizado pelas lagartas de cor creme e a cabeça escura,

medindo 1,6 mm de comprimento. Após a eclosão, as larvas penetram nas folhas, frutos ou haste e vão se tornando progressivamente verdes com a alimentação. No segundo, terceiro e quarto instar, as larvas medem aproximadamente 2,8; 4,7 e 8 mm, respectivamente, e podem ser diferenciadas com maior precisão através da medição da largura da cápsula cefálica. Após o desenvolvimento das lagartas, param de se alimentar e tornam-se pupas (URBANEJA et al., 2013).

As pupas (crisálida) são obtectas, medem de 4 a 5 mm, apresentam inicialmente coloração esverdeada e, posteriormente, coloração marrom-amarelada. Podem ser envoltas por uma teia de seda esbranquiçada, cuja função é proteção e fixação nas plantas. Quando dentro de galerias e frutos, nota-se a ausência das teias de seda. A fase de pupa dura em média 10 dias, podendo ocorrer com as pupas fixas na superfície de folhas novas e em folhas velhas, hastes, frutos e próxima a superfície do solo (BOGORNI; CARVALHO, 2006; DE CASSIA; COELHO; FRANCA, 1987; SANDA et al., 2018).

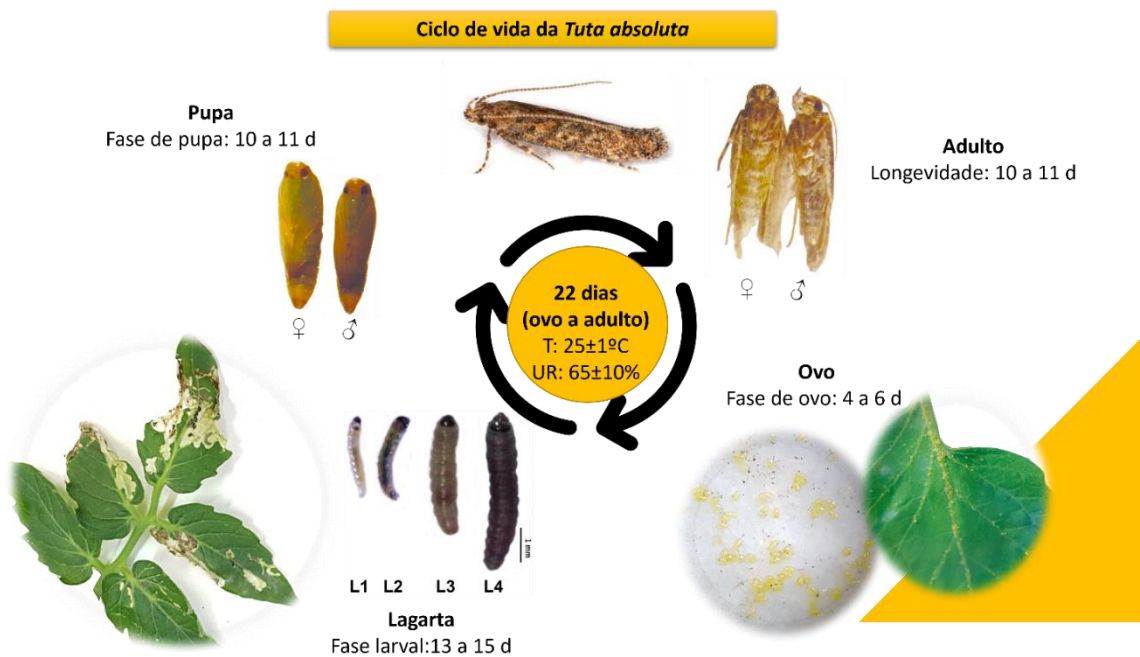


Figura 2 - Ciclo biológico da *Tuta absoluta*. Esquema demonstrando as quatro fases de desenvolvimento (ovo, larva, pupa e adulto), variação da duração de cada fase e dano foliar por *Tuta absoluta*

Os danos ocasionados pelas lagartas de *T. absoluta* na cultura do tomate são preocupantes, visto que podem atacar durante todo o ciclo de desenvolvimento da cultura (BIONDI; GUEDES; WAN, 2018). Uma importante característica da biologia

da traça-do-tomateiro é seu hábito minador e o consumo dos tecidos do mesófilo das folhas, produzindo, deste modo, minas irregulares, que posteriormente, tornam-se lesões necróticas causando redução da capacidade fotossintética e da biomassa vegetal. Já o ataque aos frutos e às hastes, são caracterizados pela formação de galerias, podendo comprometer o desenvolvimento das plantas, e tornando mais susceptíveis ao ataque de patógenos, com infecções secundárias (HARIZANOVA; STOEVA; MOHAMEDOVA, 2009; URBANEJA et al., 2013).

Considerada uma praga devastadora do tomate, a *T. absoluta* causa perdas de 80 a 100% na produção se não controlada de forma adequada (DESNEUX et al., 2010; GUILLEMAUD et al., 2015; PFEIFFER et al., 2013). As táticas de controle de *T. absoluta* são realizadas pelo uso de inseticidas químicos, feromônios sexuais e armadilhas. Além da soltura de predadores e parasitóides, da pulverização de biopesticidas à base de micro-organismos ou metabólitos secundários de plantas e incorporação de cultivares de tomateiro tolerantes (SANDA et al., 2018; URBANEJA et al., 2013).

O controle químico é o método mais utilizado, porém apresenta limitada eficiência, devido ao hábito minador da praga, que dificulta o alcance da molécula inseticida na lagarta no interior da folha, o que acarreta também rápida capacidade de surgimento de populações resistentes aos inseticidas (SILVA et al., 2016). Dos inseticidas registrados para controle de *T. absoluta*, já há relatos de populações resistente aos ingredientes ativos cloridrato de cartape, abamectina, permetrina, e, mais recentemente, as diamidas, o novo grupo de inseticidas mais usados contra lepidópteros (HADDI et al., 2012; RODITAKIS et al., 2015; SIQUEIRA; GUEDES; PIKANÇO, 2012).

O uso de agentes biológicos como bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana* ou liberação de parasitoides tem apresentado sucesso no manejo da praga para níveis limiares significativamente mais baixos (URBANEJA et al., 2012; AYNALÉM et al., 2021; GIUSTOLIN et al., 2001; PIRES et al., 2010; AYNALÉM et al., 2021; SALAS GERVASSIO et al., 2019). No entanto, no controle de pragas esses agentes de controle podem não ser eficientes para níveis populacionais altos das pragas e podem ser severamente afetados por planejamento inadequado, especialmente quando os métodos de controle químico são usados conjuntamente (PIRES et al., 2010).

Todas as táticas de manejo apresentam certa eficácia contra a praga, porém é difícil que uma única abordagem possa controlar totalmente, principalmente em grandes áreas e com altos níveis de infestação. Com isso, novas abordagens são requeridas no controle de *Tuta absoluta* para prevenir o aparecimento de populações resistentes, reduzir o excesso de pulverizações de químicos e preservar os inimigos naturais.

## **2.2 RNAi: Mecanismo do silenciamento gênico por RNA interferente (RNAi)**

Os primeiros indícios de silenciamento gênico por RNA de interferência surgiram no início da década de 1990, a partir de um trabalho que buscava a introdução de cópias extras do gene chalcona sintase (*CHS*) em petúnias visando obtenção de plantas com flores de pigmentação mais intensa. Entretanto, os resultados obtidos foram de plantas com flores totalmente ou parcialmente brancas e roxas, indicando uma diminuição da expressão de transcritos do gene endógeno, contrariando a hipótese inicial que a inserção de cópias extras poderia aumentar a expressão do gene de interesse (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990). O fenômeno foi descrito como Co-supressão. Posteriormente, com a caracterização molecular e maior compreensão do fenômeno foi denominado de 'silenciamento gênico pós-transcricional' (*post-transcriptional gene silencing* – PTGS).

Mecanismos moleculares similares foram descritos em diversos outros organismos, e estavam relacionados a um importante mecanismo natural de defesa antiviral, responsável por proteger as células contra a infecção de RNAs de vírus, ou, ainda, atuar no controle da expressão de elementos genéticos móveis (DOWNWARD, 2004; OBBARD et al., 2009). Em 1998, a partir de um estudo utilizando o nematóide *Caenorhabditis elegans*, determinou que a molécula desencadeadora do PTGS era o RNA de fita dupla (em inglês, *double-strand RNA*–dsRNA) (FIRE et al., 1998). Assim, foi cunhado o termo "Interferência de RNA" (RNAi) para nomear o silenciamento gênico a partir de moléculas de dsRNA (FIRE et al., 1998). O trabalho, de autoria principal do Dr. Andrew Fire e do Dr. Craig Mello foi laureado com prêmio Nobel em medicina e fisiologia no ano de 2006 (FIRE et al., 1998).

O RNAi é um mecanismo de regulação gênica, altamente conservado durante a evolução dos organismos eucariontes. Atua em nível pós-transcricional sobre



moléculas de mRNA no citoplasma. O mecanismo é desencadeado pela presença de um dsRNAs com sequências de nucleotídeos homólogas ao gene alvo (MEISTER; TUSCHL, 2004). As moléculas de dsRNAs são processadas por enzimas RNase-III, de uma categoria denominadas como Dicer, resultando em moléculas de cadeia dupla menores, nomeadas como pequenos RNAs de interferência (siRNA). Os siRNAs possuem tamanho de 20 a 25 nucleotídeos (nt), apresentando 2 nt protudentes (*overhanging*) na extremidade 3'-OH de cada fita, e normalmente possuem um grupo fosfato na extremidade 5' (ELBASHIR et al., 2001).

Após o processamento, o siRNA é rearranjado em um complexo efetor de multicomponentes denominado “complexo silenciador induzido por RNA” (*RNA Induced Silencing Complex–RISC*), que contém uma proteína importante da família Argonauta (Ago). A proteína Ago contém um domínio RNase-H, responsável pela clivagem e descarte de uma das fitas do siRNA, e associa a outra fita ao complexo RISC resultando em um complexo RISC ativo (KETTING, 2011). O complexo RISC se liga por complementariedade da sequência de nucleotídeos ao mRNA alvo, realiza a clivagem deste e impede que ocorra a tradução do mRNA (HUTVAGNER; SIMARD, 2008).

O silenciamento gênico de RNA é classificado em autônomo e não-autônomo. O RNAi autônomo refere-se ao silenciamento restrito as células que produzem dsRNA ou que são diretamente expostas a dsRNA introduzido experimentalmente (WHANGBO; HUNTER, 2008). Para que ocorra o silenciamento gênico nas células, ou o RNAi autônomo, é necessário que se tenha os componentes celulares para o processamento do dsRNA e formação do complexo RISC. Diferentemente, quando o dsRNA é absorvido do ambiente, há o envolvimento do RNAi não-autônomo, que engloba o processo de absorção (denominado RNAi ambiental) e o de transmissão (RNAi sistêmico), quando as células possuem a capacidade de exportar o dsRNA, ou, pelo menos, sinais de silenciamento derivados do dsRNA, para outras células distantes ou mesmo outros tecidos, e sua ocorrência depende das proteínas de membrana (SID) e da enzima RdRP (HUVENNE; SMAGGHE, 2010; JOGA et al., 2016; WHANGBO; HUNTER, 2008). Um fato importante é que o RNAi ambiental pode ser observado em organismos uni e multicelulares, enquanto RNAi sistêmico é exclusivo dos organismos multicelulares.

Desde sua descoberta, o RNAi emergiu como uma ferramenta útil em genética reversa para o estudo de função e regulação dos genes devido seu potencial silenciador de genes (BEN-AMAR et al., 2016). Por meio de estudos em biologia foi possível identificar o potencial da aplicação prática de RNAi em campos da agricultura à medicina. Em relação a agricultura, a atividade de RNAi foi alcançada em insetos (NANDETY et al., 2014). Estudos iniciais com RNAi empregavam a microinjeção como forma de entrega de dsRNA aos insetos, além da imersão de cultura de células ou larvas de insetos em soluções ricas em dsRNA, os quais forneceram embasamento para a atividade RNAi nestes organismos e auxiliaram na escolha de genes alvos essenciais para silenciamento em insetos (KOCH; KOGEL, 2014). Os silenciamentos de genes essenciais nos insetos podem levar à morte, tornando o dsRNA uma molécula inseticida para o controle de pragas.

Nos insetos, o RNAi pode ocorrer por diversas formas de entregas da molécula de dsRNA, administradas à célula por microinjeção, transfecção ou expressão de transcritos na forma de repetições invertidas (*hairpin*) ou transgenes endógenos, assim como via alimentação artificial com dieta, imersão de folha em solução, pecíolo destacado ou aplicação tópica no inseto ou planta via pulverização, injeção tronco, e absorção radicular (BURAND; HUNTER, 2013; RODRIGUES; FIGUEIRA, 2016).

Visando a aplicabilidade em campo, a alimentação e/ou ingestão da molécula de dsRNA é uma forma de entrega mais prática para controle de insetos em larga escala (YU et al., 2013). Porém, a entrega de dsRNA por ingestão possui limitações a serem superadas que influenciam na eficiência do silenciamento gênico (HUVENNE; SMAGGHE, 2010). Os lepidópteros e coleópteros possuem uma matriz ou membrana peritrófica no intestino médio, que consiste em uma rede organizada de fibrilas de quitina mantidas juntas por proteínas de ligação e glicanos, que preenchem os espaços intersticiais, criando uma peneira molecular, cujas propriedades são dependentes do conteúdo iônico e pH (HEGEDUS et al., 2009; LEHANE, 1997). A matriz peritrófica é uma barreira contra patógenos e substâncias tóxicas, bem como proteção das células do intestino a danos mecânicos (LEHANE, 2002). Também controla o transporte de alimentos para o interior do intestino médio, o que pode interferir no caminho do dsRNA até o intestino (SHI et al., 2004).

Existem também ribonucleases presentes no intestino dos insetos que podem afetar a estabilidade da molécula de dsRNA causando rápida degradação (JOGA et al., 2016; KATOCH; THAKUR, 2012; WANG et al., 2016). Mais

recentemente, em indivíduos da ordem lepidoptera, foi descoberto um gene denominado *up56*, que codifica uma proteína, 'RNAi efficiency-related nuclease' (Rease), responsável pela digestão de dsRNA tanto in vitro quanto in vivo (GUAN et al., 2018). Além disso, espécies das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera possuem intestinos com pH extremamente alcalinos (pH > 8,0), reduzindo a estabilidade da molécula de dsRNA (HARRISON, 2001).

### 2.3 Captação, transferência e amplificação do dsRNA nas células

O mecanismo de captação e movimento de dsRNA célula a célula foi descrito pela primeira vez no organismo modelo *C. elegans*, onde múltiplas proteínas SID agem com as vias endocíticas e são essenciais para a captação e dispersão de dsRNA (TIJSTERMAN et al., 2004; WINSTON et al., 2007). A proteína de membrana denominada SID-2 é responsável pela absorção dos dsRNA no intestino de *C. elegans* via ingestão, estão situadas nas células epiteliais do intestino e transportam os dsRNAs por endocitose do lúmen intestinal para o interior da célula (MCEWAN; WEISMAN; HUNTER, 2012). Posteriormente, por meio de canais SID-1, proteínas de membrana conservadas com múltiplos domínios transmembrana, exportam as moléculas de dsRNA por movimento passivo para outras células (WINSTON; MOLODOWITCH; HUNTER, 2002). Foi identificado em *C. elegans* também uma proteína SID-3 como uma tirosina quinase conservada necessária para a importação eficiente de dsRNA (JOSE et al., 2012), e uma SID-5 que interage com proteínas endossômicas tardias e auxilia na propagação extracelular do sinal de RNAi (HINAS; WRIGHT; HUNTER, 2012).

Em insetos, têm sido foram identificados ortólogos de SID-1, denominadas SID-like (SIL-A, SIL-B e SIL-C) em diversas ordens e espécies, mas, até então, não é claro o envolvimento desses ortólogos na captação dos dsRNA nesses organismos (HUVENNE; SMAGGHE, 2010; VÉLEZ; FISHILEVICH, 2018). Em pulgões do algodão e da soja (*Aphis gossypii*, *Aphis glycines*), por exemplo, as proteínas SIL são estruturalmente semelhantes a SID-1 de *C. elegans*, porém seu papel na mediação da captação de dsRNA não foi confirmado (BANSAL; MICHEL, 2013; XU; HAN, 2008). Em organismos do gênero *Tribolium*, genes semelhantes a *Sid-1* podem não ser ortólogos a *Sid-1* de *C. elegans*, mas sim ao gene *Tag-130* que não está relacionado ao RNAi ambiental em nematóides (TOMOYASU et al., 2008).

Já as espécies *Nilaparvata lugens* (XU et al., 2013), *Leptinotarsa decemlineata* (CAPPELLE et al., 2016), e *Tribolium castaneum* (MILLER; BROWN; TOMOYASU, 2008) possuem proteínas do canal tipo SID-1 que estão envolvidas no processo de absorção de dsRNA. No transcriptoma de *T. absoluta* foram encontrados homólogos de SID-1, mas não de SID-2 (CAMARGO et al., 2015). O fato é que o gene *sid-2* até agora não foi encontrado em espécies de insetos, e com base na gama de insetos estudados até agora, o papel das proteínas SIL na captação de dsRNA nesses organismos é claramente variável, com o SIL facilitando o RNAi em algumas espécies, mas não em outras (JOGA et al., 2016).

Em insetos dípteros, nenhum ortólogo SIL foi encontrado e, ainda assim, o RNAi foi demonstrado em muitas moscas e mosquitos, indicando que as proteínas SIL também não são necessárias para a captação de dsRNA nesses insetos (BOISSON et al., 2006; GOTO; KADOWAKI; KITAGAWA, 2003; PETRUK et al., 2006). Em *Drosophila melanogaster*, não foi possível identificar homólogos de SID-1, e a importação do dsRNA extracelular ocorre por um processo endocítico seletivo mediada pela proteína clatrina formando vesículas iniciais até a liberação endossômica para o citoplasma (SALEH et al., 2006; ULVILA et al., 2006). Nos insetos, a absorção de dsRNAs em várias espécies envolve a endocitose mediada por clatrina, como no *Tribolium castaneum*, *Bactrocera dorsalis*, *Diabrotica virgifera*, *Leptinotarsa decemlineata* (CAPPELLE et al., 2016; LI et al., 2015; PINHEIRO et al., 2018; SALEH et al., 2006; XIAO et al., 2015). Mas ainda não se tem conhecimento de como o dsRNA é liberado do endossomo, e este pode permanecer preso em algumas células, como por exemplo nos lepidópteros, que apresentam recalcitrância ao RNAi (YOON; GURUSAMY; PALLI, 2017).

Outro mecanismo celular importante para o efeito do RNAi é a amplificação do sinal de dsRNA, influenciado pela presença de uma RNA-polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA Polymerase - RdRP*), que amplifica gerando siRNAs secundários, que prolongam o silenciamento gênico, que podem agir na mesma célula ou serem transportados para outras mais distantes (HUVENNE; SMAGGHE, 2010; JOGA et al., 2016). O mecanismo consiste no alongamento da fita do siRNAs ligada ao mRNA alvo (ssRNA), produzindo mais moléculas de dsRNA (SIJEN et al., 2001). A RdRP está presente em nematóides e plantas, e é responsável pela resposta robusta de RNAi nesses organismos. Entretanto, em insetos, não foi encontrado nenhum homólogo canônico de RdRP (TERENIUS et al., 2011), incluindo

em *T. absoluta* (CAMARGO et al., 2015), o que pode acarretar a demanda de grandes quantidades de moléculas de dsRNA para obtenção de um efeito moderado de silenciamento gênico, especialmente em insetos das ordens Hemiptera e Lepidoptera que são menos sensíveis ao RNAi (Dalmay et al., 2000).

## 2.4 Métodos de entrega de dsRNA aos insetos

A primeira aplicação de RNAi bem-sucedida em insetos foi realizada com o método de entrega por microinjeção, que gerou a perda de asas por meio do silenciamento de dois genes em *D. melanogaster* (KENNERDELL; CARTHEW, 1998). Posteriormente, essa técnica foi utilizada em diversas espécies de insetos, como *Tribolium castaneum* (BROWN et al., 1999), *Anopheles gambiae* (BLANDIN et al., 2009), *D. melanogaster*, *Apis mellifera* (BELLÉS, 2010), demonstrando a conservação do mecanismo de RNAi nos insetos, além de ser uma ferramenta útil para estudos genômicos funcionais (JOGA et al., 2016). Em paralelo, outras formas de entrega foram sendo testadas e validadas nos insetos de várias ordens. Por exemplo, ensaios com *Plutella xylostella* mostraram que larvas alimentadas com gotículas de dsRNA apresentaram redução eficiente da expressão de um gene envolvido na resistência ao inseticida permetrina (BAUTISTA et al., 2009). Em *Bemisia tabaci* foi demonstrado que uma dieta artificial com solução de sacarose mais dsRNA resultou em mortalidade significativa, menor fecundidade e longevidade nas moscas adultas (GROVER; JINDAL; BANTA, 2019). Em *Nilaparvata lugens*, também foi testado a entrega em dieta artificial contendo dsRNA alvo para um gene de desintoxicação, o que acarretou maior sensibilidade do inseto a mecanismos naturais associados as plantas (SUN et al., 2013).

Por meio desses métodos de dieta artificial foi demonstrado que a entrega de dsRNA pela alimentação é viável para gerar silenciamento gênico nos insetos, e geraram a perspectiva de uma nova alternativa para o controle de insetos-pragas. A entrega via ingestão é um método de entrega menos invasivo, facilmente aplicável em campo, e com maior proximidade as condições reais de fonte exógena de dsRNA (HUVENNE; SMAGGHE, 2010). Entretanto precisa ser estudado criticamente em relação ao inseto-alvo, e a melhor forma de aplicar no campo para atingir apenas o inseto-alvo.

As principais formas estudadas de entrega de dsRNA a ser ingerido pelo inseto-alvo são por meio da absorção de dsRNA pela raiz, injeção em vasos de vegetais ou tronco, pulverização foliar e plantas transgênicas (JOGA et al., 2016).

O hábito alimentar é um parâmetro importante a ser considerado. Por exemplo, foi descrito que para pragas sugadoras-perfuradoras, que se alimentam de seiva do floema ou pragas que se alimentam do caule, um método de fornecimento de dsRNA em um sistema de irrigação seria eficiente, e no estudo com *Ostrinia furnacalis* isso foi demonstrado, afetando a sobrevivência da praga (LI et al., 2015). Em bioensaios com folhas destacadas após a absorção de uma solução aquosa com dsRNA foi obtido mortalidade e redução de transcritos em *Diaphorina citri*, inseto sugador de seiva do floema (ANGELOTTI-MENDONÇA et al., 2020). A seiva do floema é um meio livre de RNase ou com quantidade muito baixa, beneficiando a estabilidade do dsRNA (DOERING-SAAD et al., 2002).

Para insetos mastigadores, métodos de entrega via pulverização são indicados, e podem ser aplicáveis diretamente na praga no campo ou pulverizadas nas plantas que a praga vai se alimentar (YAN et al., 2020). Um estudo explorou a pulverização de dsRNA homólogo ao gene da *actina* de *Leptinotarsa decemlineata*, resultando em atraso no desenvolvimento do inseto ou mortalidade, e fases de segundo instar não conseguiram sobreviver até o quarto instar em plantas de batata tratadas (SAN MIGUEL; SCOTT, 2016). O dsRNA mostrou-se estável por 4 semanas na planta (SAN MIGUEL; SCOTT, 2016). Outro estudo demonstrou que a pulverização de dsRNA diretamente em lagartas de primeiro instar de *Helicoverpa armigera* resultaram em alta mortalidade e ecdise anormal em lagartas e pupas (ZHANG et al., 2015).

Na ordem Lepidoptera é a fase jovem, que ocasiona danos diretos as plantas, com hábito alimentar mastigador, ingerindo bastante tecido vegetal (GALLO et al., 1988). Estudos de RNAi em lepidópteros foram realizados por uma técnica de alimentação por gotas contendo solução de sacarose e dsRNA, resultando no silenciamento da carboxilesterase (EposCXE1) no inseto *Epiphyas postvittana* (TURNER et al., 2006). Os níveis de transcrição do EposCXE1 caíram gradualmente e não instantaneamente ao longo do tempo pós-alimentação, com os níveis de expressão relativa mais baixos ocorrendo 7 dias após a alimentação (TURNER et al., 2006). Também foi demonstrada a eficiência de RNAi com a entrega de dieta contendo *Escherichia coli* expressando dsRNA de *quitina sintase* (*SeCHSA*),

diminuindo a taxa de sobrevivência de *Spodoptera exigua* (TIAN et al., 2009). Testes de injeção de dsRNA em embriões de *Plodia interpunctella* também resultaram em silenciamento do gene triptofano oxigenase e perda de pigmentação da cor dos olhos (FABRICK; KANOST; BAKER, 2004). Outros estudos com lepidópteros, demonstram que tanto a entrega de dsRNA por injeção como alimentação com gotas contendo dsRNA, reduziu significativamente os níveis de transcrição do gene da serina-protease (SfT6), diminuindo em mais de 90% em relação ao tratamento controle, sendo ligeiramente mais proeminentes quando o dsRNA foi administrado por via oral (RODRÍGUEZ-CABRERA et al., 2010).

Focando no silenciamento de Lepidopteros, é necessário que se tenha uma produção suficiente de dsRNA para entrega aos insetos que apresenta certa recalcitrância (GUAN et al., 2018). Os dsRNA podem ser produzidos em microrganismos (bactérias, fungos e vírus), in vitro com kits específicos, sistemas livres de célula, e em plantas transgênicas (SILVER; COOPER; ZHU, 2021).

A produção sintética em larga escala das moléculas de dsRNA está em expansão e se tornando mais econômica, facilitando as aplicações em campo. Estudo mostra que o uso de moléculas sintéticas, produzidas in vitro e livre de célula afetou a sobrevivência e diminuiu a expressão do gene-alvo no inseto *Leptinotarsa decemlineata* (RODRIGUES et al., 2021). Assim como, o uso dessas moléculas afetou o crescimento e sobrevivência de *L. decemlineata*, e em campo o controle do inseto foi tão eficaz quanto o controle do inseticida spinosad, mas com uma atividade mais lenta comparado ao spinosad que age bem mais rápido no controle do inseto (PETEK et al., 2020).

Outra estratégia de entrega de dsRNA incluem engenharia genética de plantas. O desenvolvimento de plantas transgênicas de RNAi inicia-se, de modo geral, a partir da escolha do gene-alvo para silenciamento gênico do inseto, cujo RNA é extraído e utilizado para síntese do DNA complementar (cDNA), o qual é utilizado para amplificação dos fragmentos do gene-alvo por reação de cadeia de polimerase (em inglês, *Polymerase Chain Reaction - PCR*) para então, clonagem do produto de PCR em um vetor plasmidial (CAMARGO et al., 2016; FACTOR et al., 2022).

Um vetor de silenciamento, de forma geral, é constituído de uma região promotora que direciona a expressão dos fragmentos do gene-alvo no sentido senso e antissenso, sendo separados por uma região intrônica, até uma sequência terminadora (PRASKAD et al., 2017; FACTOR et al., 2022). A obtenção das plantas transgênicas de RNAi se baseia em inserir os fragmentos em repetições invertidas das sequências dos genes-alvo do inseto-praga no genoma da planta (FACTOR et al., 2022). A transformação nuclear de uma célula vegetal com o vetor de silenciamento permite que maquinaria de transcrição da célula expresse os dsRNAs em forma de grampo e, a partir da recuperação in vitro do material transformado, obtenção de planta transgênica de RNAi (BAUM et al., 2007; CAMARGO et al., 2016).

Plantas transgênicas de RNAi foram testadas para o controle de insetos das ordens Coleoptera e Hemiptera (KATOCH et al., 2013), por exemplo para o controle de *Diabrotica virgifera* em milho (BAUM et al., 2007), *Sitobion avenae* em trigo (XU et al., 2014) e, mais recentemente, de *Bemisia tabaci* em plantas de tabaco (GONG et al., 2021). Também já demonstraram resultados significativos no controle de lepidópteros, como obtenção de 40% de mortalidade e redução de cerca de 50% no peso de lagartas de *T. absoluta* quando alimentadas com folíolos de plantas transgênicas de tomateiro expressando genes-alvo da *V-ATPase A* e *AK* (CAMARGO et al., 2016). Outro trabalho obteve mortalidade de 57,5; 67,5; 70 e 50% em pupas de *Spodoptera litura*, *Chilopartellus*, *Plutella xylostella* e *Maruca vitrata*, respectivamente, pelo silenciamento do gene-alvo chitin synthetase A por meio da ingestão de plantas de tabaco transgênicas de RNAi (RANA et al., 2020).

Eventos transgênicos são capazes de induzir níveis distintos de expressão dos dsRNAs nas plantas, visto que raramente os transgenes se inserem nos mesmos locais genômicos e em mesmo número de cópias no genoma das plantas (RANA et al., 2020). Ainda é importante evidenciar que a inserção do transgene é aleatória e pode ocorrer em regiões promotoras ou dentro dos genes da planta, e, desse modo, pode influenciar negativamente no desenvolvimento, crescimento e reprodução vegetal e, em casos extremos, impedir a viabilidade do material transformado (LATHAM et al., 2006).

Os dsRNA expresso em plantas transgênicas é susceptível ao processamento pela maquinaria de RNAi da própria planta, sendo, então, o dsRNA processado em siRNA pela ação de ribonucleases ainda no interior da célula vegetal, o que reduz a eficiência do silenciamento de genes-alvo do inseto-praga quando a planta



transgênica é consumida por gerar siRNAs distintos da maquinaria do inseto? (KUNTE et al., 2019). Entretanto, como uma estratégia de superar a ação das ribonucleases, utiliza-se da transformação cloroplastidial de plantas, ou seja, a inserção e expressão dos transgenes no genoma do cloroplasto que não possui maquinaria de processamento de dsRNAs (ZHANG et al., 2017).

Outros aspectos negativos relacionados a utilização de plantas transgênicas de RNAi para controle de pragas são relacionados ao alto custo envolvido e longo processo de regulamentação de produtos transgênicos, além de resistência na aceitação pelo consumidor, visto que, no Brasil, cerca de 50% dos consumidores associam plantas transgênicas à aspectos negativos (CAPALBO et al., 2015; KUNTE et al., 2019).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Criação da Traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*)

A criação dos insetos foi mantida segundo a metodologia adaptada de Bajonero e Parra (2017), no Laboratório de Melhoramento de Plantas (LAMP/CENA) (Figura 3). A colônia foi obtida a partir de insetos doados da criação de *Tuta absoluta* da empresa FMC Agrícola. As lagartas recém-eclodidas foram transferidas para plantas de tomateiro (*S. lycopersicum*) cultivar “Santa Clara”, e mantidas em gaiolas de acrílico de dimensões 70x50x50 cm em sala com ambiente controlado, com temperatura de 25°C ± 2°C, fotofase de 14h e umidade relativa de 50-70%. Após o período de alimentação das lagartas e período de pupa em uma gaiola, os adultos que emergiam eram transferidos para outra gaiola reservada à cópula e postura, onde foram mantidos folíolos de tomateiro “Santa Clara” para que houvesse a centralização das posturas, otimizando a coleta dos ovos. As gaiolas foram monitoradas diariamente para coleta de adultos recém-emergidos, fornecimento dos alimentos e limpeza de resíduos.

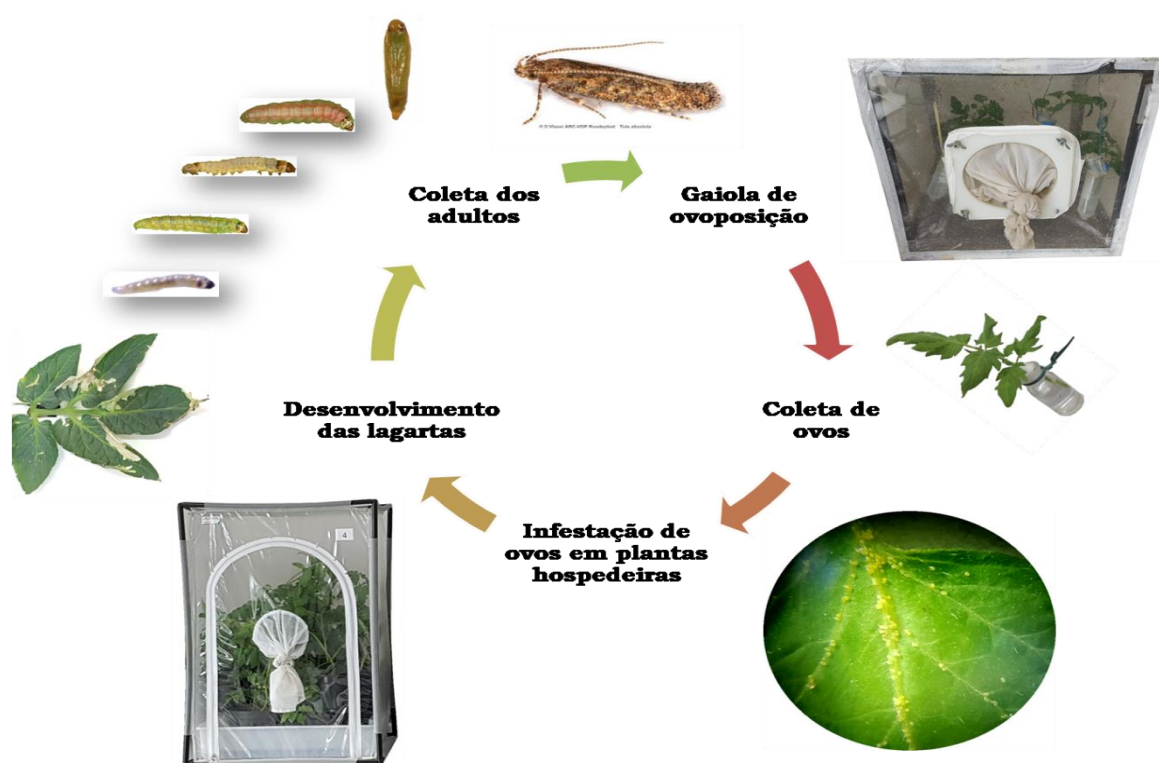


Figura 3 - Criação de *Tuta absoluta*. Esquema mostrando as etapas realizadas na manutenção da população de *Tuta absoluta* em laboratório

### 3.2 Material vegetal

Nos ensaios de alimentação foram utilizadas plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cv. Micro-Tom comum e linhagens Micro-Tom transgênicas com construções de silenciamento do gene *V-ATPase* (pK7GWIWG2(l)::35*SATPase-esaPTA*) e *Arginina quinase* (pK7GWIWG2(l)::35*SAK-KA*) (CAMARGO et al., 2016). As linhagens transgênicas T<sub>0</sub> foram avançadas até a geração T<sub>3</sub>, selecionadas através da pulverização de solução de canamicina 400 mg/L em mudas de 14 dias de idade. A solução de canamicina foi pulverizada durante três dias consecutivos nas mudas e aquelas que não apresentaram clorose foram levadas a diante para coleta de sementes. As linhagens T<sub>2</sub> que geraram plantas T<sub>3</sub> 100% resistentes a canamicina foram consideradas homozigotas, e em seguida, caracterizadas para a presença do inserto e para o nível de expressão do transcrito e usadas nos ensaios de entrega as lagartas de *T. absoluta*.

### 3.3 Otimização de ensaio com plantas de tomateiro Micro-tom

Foi realizado um ensaio inicial para analisar a alimentação da *Tuta absoluta* em plantas de tomateiro Micro-tom, com o objetivo de definir o número adequado de lagartas por folha que permitisse uma avaliação precisa de dano foliar e analisar o desenvolvimento do inseto nestas plantas. O ensaio foi realizado com três tratamentos e cinco repetições por tratamento. Os tratamentos foram definidos com diferentes densidades de lagartas colocadas por planta. Cada repetição consistia em uma planta com 30 dias após a sementeira. Foram colocadas 3, 6 e 9 lagartas recém eclodidas em uma folha por planta, posicionando uma lagarta por folíolo (Figura 4) e dependendo do tratamento duas ou três lagartas por folíolo. Posteriormente a folha foi envolvida por um saco de argan, fazendo as lagartas se alimentarem de uma única folha. O ensaio foi conduzido em condições controladas, com temperatura de 25°C ± 2°C, fotofase de 14h e umidade relativa de 50-70%. Os parâmetros biológicos avaliados foram duração das fases de desenvolvimento (lagarta, pupa e adulto), viabilidade larval e de pupa, que correspondem a porcentagem de lagartas que se tornaram pupas e pupas que originaram adultos respectivamente. A área do dano foliar foi medida através do Software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

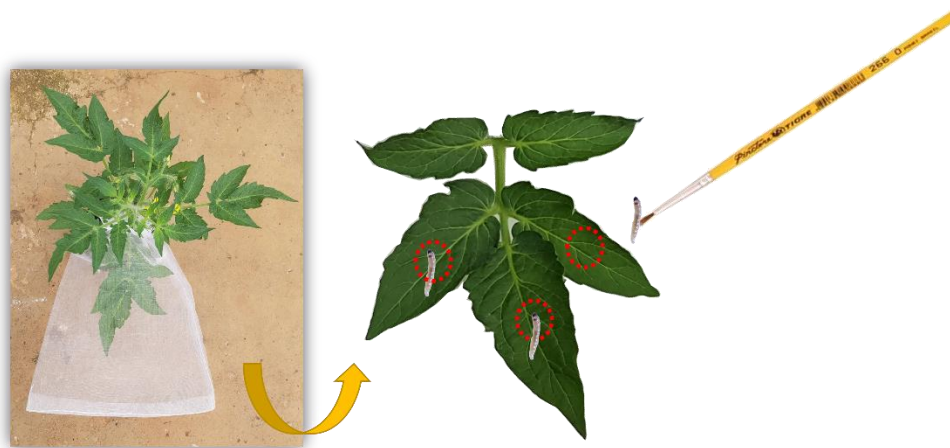


Figura 4 – Representação da metodologia usada para transferência de três lagartas recém eclodidas de *Tuta absoluta* em uma folha do tomateiro Micro-Tom. Não representa o tamanho real dos objetos.

### 3.4 Extração de DNA e análise por PCR das linhagens transgênicas

Amostras das folhas mais novas expandidas no ápice das plantas Micro-tom transgênicas de RNAi foram coletadas aos 28 dias após sementeira. Os tecidos vegetais foram macerados em cadinho com o uso de nitrogênio líquido. O DNA total foi extraído pelo método Doyle & Doyle (1990) modificado, utilizando cerca de 150 mg de material vegetal. O DNA total foi quantificado em fluorômetro (Thermo Scientific) e a qualidade do DNA extraído foi confirmada em gel de agarose 1%. Para confirmação da presença dos transgenes nas amostras de DNA foi realizado a técnica de Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction - PCR). Foram utilizados primers específicos (Tabela 1) para amplificação das regiões do gene *V-ATPase* e *AK*, citados no trabalho de Camargo (2016). Para amplificação do *AK* foi testado também um iniciador sentido do promotor 35S (GCACAATCCCACTATCCTTC) juntamente com um iniciador reverso específico do gene alvo. A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: 25 ng de DNA genômico, 2,5 ul de tampão 10x, 1,5 Mm de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 μM de dNTP's, 0,1 μM de cada *primer*, 1,5 U de enzima *Taq* DNA polimerase, em volume final de 25ul. As condições de amplificação em termociclador foram 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 15s, 63°C por 25s e 72°C por 40s e extensão final de 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1% agarose.

### 3.5 Extração de RNA para a síntese de cDNA e confirmação da expressão das linhagens transgênicas por amplificação quantitativa de transcritos reverso (RT-qPCR)

A confirmação da expressão de transcritos transgênicos foi realizada por amplificação quantitativa de transcritos reverso (RT-qPCR). Os experimentos continham cinco replicatas biológicas e cada replicata um *pool* de quatro folhas de plantas diferentes do mesmo evento/linhagem transgênica. O RNA total foi extraído a partir de cerca de 100 mg de tecido foliar com o reagente Trizol (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. A concentração de RNA total foi estimada por absorvância sem diluição prévia usando NanoDrop (ThermoScientific) e a qualidade foi avaliada por eletroforese em gel 2% de agarose com brometo de etídeo. Para a síntese de cDNA, 4 µg de RNA foram tratados inicialmente com DNase I e inibidor de RNase Ribolock (Fermentas), seguido da transcrição reversa usando SuperScript III (ThermoScientific) com 1,5 µg do RNA tratado. A qualidade do cDNA foi analisada com a amplificação via PCR com *primers* de actina (Tabela 1), e visualizado em gel de 2% agarose.

A reação de RT-qPCR continha 5 µL of SYBR Green qPCR Master Mix (Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA), 0,2 µM de cada primer, 1 µL of the 1:10 (v/v) cDNA e água Milli-Q estéril para completar volume final de 14 µL. A análise de RT-qPCR foi realizada no RotorGene-6000 (Qiagen; Hilden, Alemanha), e foi incluído um controle negativo sem cDNA. As condições de amplificação no termociclador foram inicialmente 50°C por 2 min e 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de três etapas: 95°C por 20 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s. Após a amplificação, foi determinado a curva de dissociação entre 72 e 95°C. Em todos os experimentos, valores de  $C_q$  (ciclo de quantificação) foram usados para determinar a diferença de expressão relativa dos genes. A expressão relativa foi padronizada com o gene de actina de tomateiro como referência, e a expressão relativa foi calculada de acordo Livak & Schmittgen (2001). O delineamento foi de cinco réplicas biológicas e duas réplicas técnicas.

Tabela 1 – Sequências de primers específicos usados no PCR e RT-qPCR

Gene	Senso	Antisenso	Amplicon (pb)
<b>V-ATPase A</b>	ACCTGTCCGAGATCGTGACAG	AACGGGCAGAAACGGTCGTA	139
<b>AK</b>	GGCACATTCTACCCACTCAC	GATGGTCCTCTTCGTTGCAC	190
<b>Actina</b>	GGTCCCTCTATTGTCCACAG	TGCATCTCTGGTCCAGTAGGA	100
<b>EF1</b>	CCTGGGCACAGAGATTTTCAT	GTCCGTTCTTGGAGATACCG	118

### 3.6 Ensaio de Dano foliar com tomateiro Micro-Tom transgênico

As plantas transgênicas de tomateiro Micro-tom expressando dsRNA dos genes *V-ATPase A* e *AK* foram entregues para lagartas recém eclodidas de *Tuta absoluta*. Todos os ensaios de entrega a seguir foram mantidos em temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotofase de 14h e umidade relativa de 50-70%, e as folhas envolvidas com saco de argan, fazendo as lagartas se alimentarem de uma única folha.

Foram realizados dois ensaios de dano foliar com plantas transgênicas. Um para o gene *AK* composto de três tratamentos, duas linhagens *AK* (*AK6* e *AK3*) e o controle Micro-tom não transgênico (*MT*). E uma para o gene *V-ATPase A*, composto de cinco tratamentos, quatro linhagens: *VATPase 1.2*, *VATPase 4.1*, *VATPase 6.2*, *VATPase 11*, e o controle Micro-tom não transgênico (*MT*). Em ambos os ensaios foram utilizadas 12 plantas por tratamento com 35 dias após semeadura, sendo que em cada planta foi selecionado 2 folhas para transferência de 3 lagartas por folha ( $n=72$ ) como demonstrado na Figura 4. Após 12 dias de alimentação, as lagartas foram coletadas e pesadas em balança de precisão, e mantidas em placa de petri até a formação de pupa. As pupas foram pesadas com 24 horas após formadas.

E fotos foram tiradas das folhas para o cálculo da área foliar consumida ( $\text{cm}^2$ ) com auxílio do Software ImageJ.

### 3.7 Ensaio de silenciamento gênico com tomateiro Micro-Tom transgênico

Para verificar o silenciamento gênico nas lagartas de *T. absoluta* causado pela alimentação em plantas de tomateiro Micro-tom transgênicas, foi realizado um ensaio

para linhagens *AK*, e outro para linhagens *V-ATPase*. Em ambos os ensaios foram avaliados o silenciamento dos genes alvos (*AK*, *V-ATPase*) em três tempos (2, 4 e 6 dias) após o início da alimentação de lagartas recém eclodidas. Em cada tratamento foi transferido 20 lagartas por planta, e havia quatro plantas ou repetições por tratamento. Foram selecionados para os ensaios, os dois eventos de cada um dos genes alvos que obtiveram o melhor controle da herbivoria de *T. absoluta*, o *AK3*, *AK6*, *VATPase 4.1* e *VATPase 1.2*.

### **3.8 Extração de RNA e síntese de cDNA das amostras de *T. absoluta* para análise de expressão por RT-qPCR**

Para a análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) dos ensaios de silenciamento gênico em lagartas de *T. absoluta*, foi extraído o RNA total de um pool de 20 lagartas por amostras ou réplicas biológicas. A maceração das amostras foi realizada com o auxílio do homogeneizador de amostras Bead Ruptor 24 Elite (Omni International, Inc., Kennesaw, GA), em tubos eppendorf 1,5 ml. Posteriormente, a extração de RNA foi realizada seguindo o protocolo do kit de extração de RNA Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research) que utiliza amostra preparada em reagente TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e extração em coluna Zymo-Spin Column. Após extração, o RNA total foi quantificado em NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA) e sua integridade foi visualizada em gel TAE de 1% agarose corado com 1,5% (v/v) de brometo de etídeo. O RNA total foi tratado utilizando 2 µg do RNA de cada amostra e 2 U de DNase I (Life Technologies) em tampão apropriado seguindo o protocolo da enzima. As amostras foram quantificadas novamente após tratamento, e 600 ng de RNA tratado foi utilizado para a síntese de cDNA, acrescidos de 1 ul de oligo (dT) (50mM) e água DEPC inativa. As amostras foram incubadas a 65°C por 5 minutos, resfriadas a 10°C, seguida da adição de 4 ul de 5X First-Strand Buffer, 1 ul de DTT (0,1M), 40 U de Ribolock, 1 ul de dNTP (10mM) e 200 U de SuperScript® III RT (Life Technologies). A reação foi incubada a 25°C por 15 min, 50°C por 60 min e 70°C por 15 min.

Após a síntese, foi analisada a qualidade do cDNA por amplificação via PCR com primers específicos do gene *elongation factor 1-alpha (EF1 alpha)* (Tabela 1) e visualização em gel TAE 2% de agarose. Os cDNA foram utilizados na reação de qPCR, na diluição de 1:10 (v/v) de cDNA e água Mili-Q autoclavada na reação com

*primers* de *V-ATPase A* (Tabela 1) a 5mM, e diluição 7:10 (v/v) na reação com *primers* de *AK* (Tabela 1) a 10mM, ambos com volume de 0,2 ul adicionados à reação. A reação de qPCR também continha 5 µL of SYBR Green qPCR Master Mix (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA). A análise de RT-qPCR foi realizada no RotorGene-6000 (Qiagen; Hilden, Germany), e foi incluído um controle negativo sem cDNA. As condições de amplificação no termociclador foram inicialmente 50°C por 2 min e 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de três etapas: 95°C por 20 s, 60° C por 30 s e 72°C por 30 s. Após a amplificação, foi determinado a curva de dissociação entre 72 e 95°C. Em todos os experimentos, valores de CQ (ciclo de quantificação) foram usados para determinar a diferença de expressão relativa dos genes. A expressão relativa foi padronizada usando o gene *elongation factor 1-alpha (EF1 alpha)* como gene de referência, e calculada utilizando a equação de Livak & Schmittgen (2001). As análises de RT-qPCR foram realizadas com quatro réplicas biológicas e duas réplicas técnicas.

### **3.9 Síntese de dsRNA sintético e entrega para lagartas de *Tuta absoluta***

As sequências dos genes *AK* e *V-ATPase A* inseridas no vetor de silenciamento para a transformação do tomateiro Micro-tom, realizada por Camargo (2016), foram utilizadas para a síntese de dsRNA. As sequências continham 285 pb para *V-ATPase* (GenBank: KM591219) e 262 pb para *AK* (GenBank: KM591220). O gene da proteína verde fluorescente (*GFP*) foi usado como controle negativo. O vetor GFP::L4440 foi utilizado para seleção de uma sequência de 262 pb do gene *GFP*. Os dsRNAs foram produzidos pela empresa RNA Greentech LLC, Texas, EUA, por um método de transcrição in vitro usando um modelo de DNA contendo um promotor T7 em ambas as extremidades, uma enzima conhecida como T7 RNA polimerase e ribonucleosídeo trifosfato (rNTP).

O ensaio de entrega de folíolos de tomate Santa Clara foi realizado com quatro tratamentos (*AK*, *V-ATPase A*, *GFP* e água) e quatro doses de dsRNA (1, 2, 4 e 8 µg), e cada tratamento com 10 repetições (Figura 5). Primeiramente, os folíolos destacados foram mantidos de molho em solução de 2% de hipoclorito durante 10 min, seguido da lavagem em água corrente e mais 20 min de molho em água destilada. Em seguida, os folíolos foram colocados em tampas de tubo Falcon para absorção de 4 mL de solução aquosa contendo dsRNA. Após 24h apresentando absorção total das soluções os folíolos foram transferidos para tubos Falcon de



15 ml com solução nutritiva de Hoagland (HOTHEM; MARLEY; LARSON, 2003) diluída em 10x. Após 6 dias de alimentação das lagartas de *T. absoluta*, foi avaliada a área foliar consumida em cada tratamento.

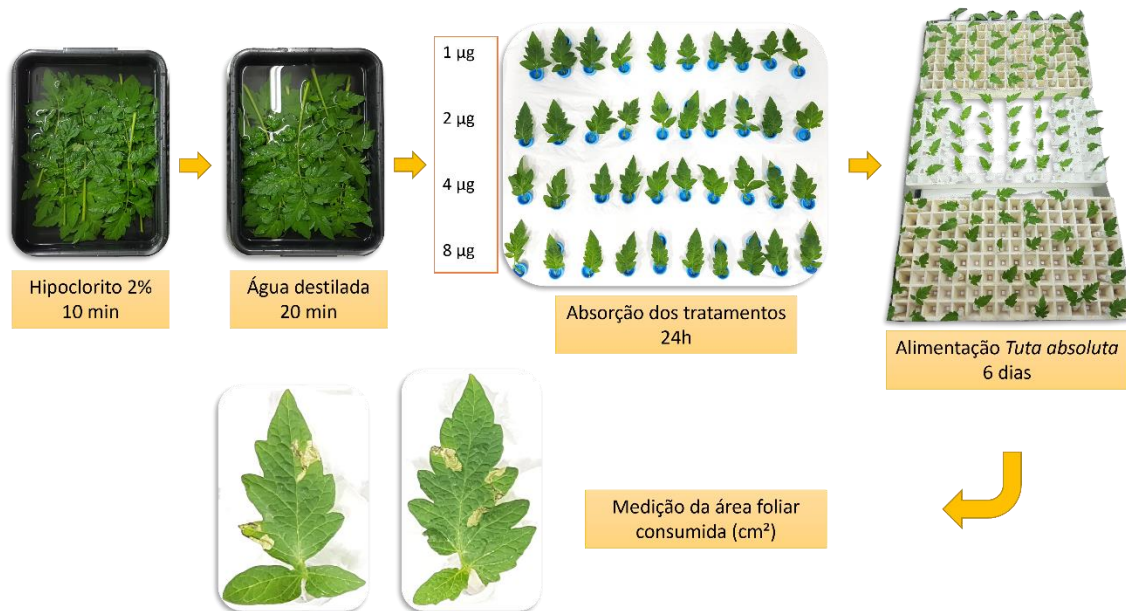


Figura 5 – Representação da metodologia utilizada no ensaio de entrega de dsRNA sintético absorvidos por folíolos de tomate Santa Clara.

### 3.10 Análise estatística

Os níveis de expressão relativa dos genes *AK* e *V-ATPase A* das linhagens transgênicas foram analisados por *One-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey em  $p < 0,05$ .

Os níveis de expressão relativas dos genes *AK* e *V-ATPase A* em lagartas de *T. absoluta* coletadas nos diversos tempos de alimentação em plantas transgênicas foram analisados por *Two-way* ANOVA. As comparações pareadas foram realizadas usando o teste *t* em  $p < 0,05$ .

Nos ensaios de medição da área foliar consumida, peso de lagarta e pupa, e duração da fase larval os dados foram analisados por *One-way* ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey em  $p < 0,05$ .

Os dados de área foliar consumida no ensaio de entrega de dsRNA com doses crescentes foram analisados por *Two-way* ANOVA, e comparações pareadas usando o teste *t* em  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Otimização de ensaio com plantas de tomateiro Micro-tom

Inicialmente foi conduzido um ensaio para analisar a alimentação da *Tuta absoluta* em plantas de tomateiro Micro-tom com o objetivo de determinar o número suficiente de lagartas por folha que permitisse a alimentação e sobrevivência dos indivíduos até o final do ciclo de vida, e permitir a avaliação precisa dos danos foliares causados pela alimentação das lagartas. Os parâmetros biológicos avaliados nesse primeiro ensaio foram a duração das fases de desenvolvimento da *T. absoluta* (lagarta, pupa e adulto), viabilidade larval e pupal, que corresponde a porcentagem de lagartas que se tornaram pupa e pupas que originaram adultos, e a análise da área do dano foliar para facilitar a medição.

#### 4.1.1 Fase Larval

Primeiro analisamos se a duração das fases de desenvolvimento da *T. absoluta* em tomateiro Micro-tom seria normal comparando com trabalhos de referência e se as densidades ou número de lagartas testados por folha influenciaria no desenvolvimento da fase larval. A duração da fase larval foi afetada pelo número de lagartas colocadas por folha. No tratamento de maior número de lagartas por folha (9 lagartas/folha) a duração média da fase larval foi de 10,63 dias, menor em relação aos outros tratamentos, diferenciando significativamente do tratamento com 3 lagartas/folha, que apresentou duração de 11,8 dias (Tabela 2).

Tabela 2 – Duração das fases de larva, pupa e adultos de *Tuta absoluta* alimentadas em plantas de tomateiro Micro-Tom. O número de lagartas por folha representa os tratamentos. Médias seguidas de letras diferentes mostram diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ )

Tratamento	Nº lagartas/folha	Duração da fase (dias)		
		Larva	Pupa	Adulto
Trat 1	3	11,8 a		
Trat 2	6	11,08 ab	7 a 8	4 a 10
Trat 3	9	10,63 b		

Comparando a duração da fase larval com estudo da biologia da *T. absoluta* em cultivar de tomate do grupo Santa Cruz, o cultivar Santa Clara que favorece o desenvolvimento das populações desta praga devido sua suscetibilidade, foi observada uma duração da fase larval de 12,45 dias em condições controladas de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ;  $65\pm 10\%$ UR e fotofase de 12h (BOGORNÍ; CARVALHO, 2006). Em outro trabalho que estudou o consumo do mesófilo foliar por *T. absoluta* foi observada uma duração de 12,6 dias de fase larval em condições controladas de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ;  $65\pm 10\%$ UR e fotofase de 12h (BOGORNÍ; SILVA; CARVALHO, 2003). Diferenciando um pouco desse valores, lagartas também alimentadas de folhas de cultivar Santa Clara demonstraram uma fase larval de 10,68 dias em condições de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $70\pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas (MIHSFELDT; PARRA, 1999). Os valores de fase larval obtidos no ensaio conduzido aqui em Micro-Tom estão próximos aos descritos, com variações que podem ter ocorrido devido a densidade de lagartas, na maior densidade (9 lagartas/folha), as lagartas consumiram mais rapidamente a folha, provocando um encurtamento da fase.

#### **4.1.2 Fase de pupa e adulto**

Posteriormente, analisamos a duração da fase de pupa obtida que durou entre de 7 a 8 dias. Todos os tratamentos, apresentaram esse intervalo de duração da fase de pupa, o que, portanto, não foi afetado pelas densidades de lagartas dos tratamentos. Comparamos essa duração a estudos mencionados anteriormente, que analisam o desenvolvimento de *T. absoluta* em cultivar de tomate Santa Clara, e quando foram observadas duração da fase de pupa de 7,47 dias (BOGORNÍ; CARVALHO, 2006) ou 7,44 dias (MIHSFELDT; PARRA, 1999), demonstrando que as pupas sob condições ambientais controladas apresentam comportamento similar quando alimentadas em Micro-Tom em relação a cultivar Santa Clara.

A longevidade dos adultos observadas no presente trabalho variou de 4 a 10 dias em todos os tratamentos. No entanto, não foi oferecida nenhuma solução açucarada que pudesse regular a duração desta fase. Na literatura a longevidade descrita varia entre 10 e 15 dias para as fêmeas e 6 a 7 dias para machos (DESNEUX et al., 2010; URBANEJA et al., 2012).

### 4.1.3 Viabilidade das fases de *T. absoluta*

O ensaio de otimização da densidade de lagartas demonstrou que o tomateiro Micro-Tom pode ser um hospedeiro viável para ensaios de laboratório com *Tuta absoluta*. Tanto a viabilidade larval como a pupal apresentaram valores igual ou superior a 80% em todas as densidades de lagartas testadas por folha (Tabela 3). Comparando esses resultados de viabilidade com trabalhos que avaliaram a biologia da *T. absoluta* em cultivares de tomate Santa Clara, observa-se valores similares. Empregando a cultivar Santa Clara, a viabilidade larval observada foi de 79,7% e pupal de 93,55% sob condições ambientais controladas de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $65 \pm 10\% \text{UR}$  (BOGORNÍ; CARVALHO, 2006). Empregando o Micro-Tom, foi observada viabilidade larval variando de 88,9 a 93,3% entre os tratamentos de densidades de lagartas por folha, e de 80 a 100% de viabilidade pupal (Tabela 3). Portanto, as altas viabilidades larvais observadas em 'Micro-Tom' são comparáveis aos dados observados na literatura, enquanto a viabilidade pupal se apresentou um pouco menor e ou maiores dependendo do número de lagartas por folha. Outro trabalho também obteve viabilidades semelhantes em lagartas de *T. absoluta* alimentadas de folhas de tomate Santa Clara em condições de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\% \text{UR}$  e fotofase 14h. Os valores foram viabilidade larval de 91,67% e pupal de 89,09% (MIHSFELDT; PARRA, 1999).

Tabela 3 – Viabilidade média das fases de larva e pupa de *Tuta absoluta* alimentadas em plantas de tomateiro Micro-tom nas diferentes densidades de lagarta por folha ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotofase:14h;  $60 \pm 10\% \text{UR}$ )

Tratamento Nº de lagartas/folha	Viabilidade média (%)		n
	Larva	Pupa	
3	93,3	80,0	15
6	86,7	92,0	30
9	88,9	100,0	45

### 4.1.4 Dano foliar

Além da análise dos parâmetros biológicos das fases de desenvolvimento de *T. absoluta* para otimização de ensaios utilizando plantas de tomateiro Micro-Tom, foi avaliada o padrão de herbivoria das lagartas nestas plantas. O objetivo foi definir um melhor método para facilitar a medição do dano foliar por meio do *software* ImageJ.

A evolução do dano foi acompanhada após a transferência de 3, 6 e 9 lagartas por folha, e foram registradas em três tempo, aos 5, 7 e 9 dias após a transferência. Foi concluído que para avaliação do dano foliar, o melhor tratamento foi aquele com três lagartas por folha por não apresentar folhas deformadas que dificultasse a medida da área da lesão e por fornecer alimento suficiente para as lagartas (Figura 6).

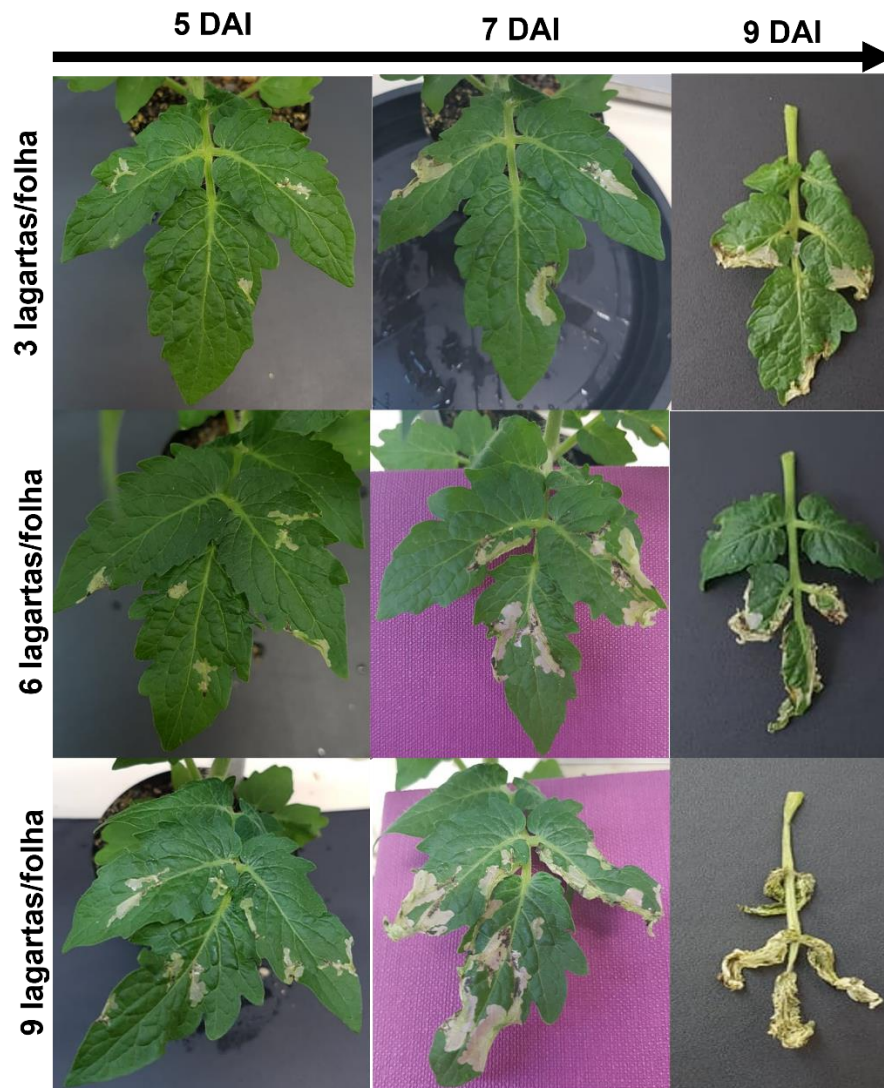


Figura 6 – Representação da evolução do dano foliar causado pela fase larval de *Tuta absoluta*, nas densidades de 3, 6 e 9 lagartas por folha aos 5, 7 e 9 dias após início da alimentação.

O ensaio de otimização com plantas de tomateiro Micro-Tom permitiu a definição de uma metodologia de uso de plantas de tomateiro Micro-Tom, proporcionando a estimativa do dano causado pela herbivoria e a finalização do ciclo

de vida das lagartas. O tratamento com 3 lagartas por folha, foi o que apresentou a duração da fase larval mais próxima aos estudos com plantas de tomate do cultivar Santa Clara, onde a *T. absoluta* apresenta melhor desenvolvimento do seu ciclo biológico. Além disso, foi demonstrado que as fases de pupa e adulto também se desenvolvem normalmente, apresentando altas viabilidades da fase larval e pupal. O tratamento com 3 lagartas por folha também apresentou melhores condições para a avaliação do dano foliar, podendo ser facilmente replicável.

#### **4.2 Ensaio de alimentação com tomateiro Micro-Tom transgênico**

A partir da determinação do método adequado para ensaios com plantas Micro-Tom, foram conduzidos ensaios para avaliar a entrega de dsRNA pelas plantas transgênicas de tomateiro Micro-Tom expressando fragmentos dos genes *AK* e *V-ATPase A*. As linhas transgênicas foram obtidas por Camargo et al. (2016) empregando os dois genes alvos (*V-ATPase A* e *AK*) com base na resposta de RNAi relatada para esses genes em outras espécies de pragas. Os fragmentos de genes alvos foram clonados em vetor de silenciamento binário pK7GWIWG2(I). As construções de silenciamento foram usadas para transformação de Micro-Tom. Foram gerados oito eventos *V-ATPase A* e cinco *AK* positivos para a presença do gene, do transcrito e siRNA esperados (Camargo et al., 2016). A entrega por folhas de Micro-Tom transgênicos na geração  $T_0$  para lagartas de *T. absoluta* recém eclodidas resultou em mortalidade e diminuição do peso larval (Camargo et al, 2016).

No entanto, para avaliar o potencial de controle de herbivoria por esses genes, é analisar os eventos em homozigose para obtenção do efeito real. Para isso, foram escolhidos alguns eventos *V-ATPase* e *AK* de acordo com a disponibilidade de sementes em  $T_0$  e após a análise positiva para a presença do transgene. Os eventos em gerações precoces foram avançados até a geração  $T_3$  por meio de autofecundação seguido de seleção para presença do inserto pela pulverização com Kanamicina e escolha das plantas sem clorose. A partir de cinco eventos *AK*, foram selecionados os eventos AK3, AK5 e AK6, e dos oito eventos *V-ATPase A*, qforam selecionados os eventos denominados independentes VATPase 1.2, VATPase 4.1, VATPase 6.2 e VATPase 11.

#### 4.2.1 Caracterização molecular dos eventos transgênicos

Para caracterizar os eventos *V-ATPase A* e *AK*, folhas novas do ápice caulinar foram coletadas para extração de DNA e confirmação da presença do transgene por PCR empregando iniciadores (primers) específicos para amplificação de fragmentos dos genes *V-ATPase* e *AK*. Todos os eventos apresentaram amplificação dos respectivos genes na análise de PCR, confirmando a presença do transgene no genoma da planta (Figuras 7 e 8).

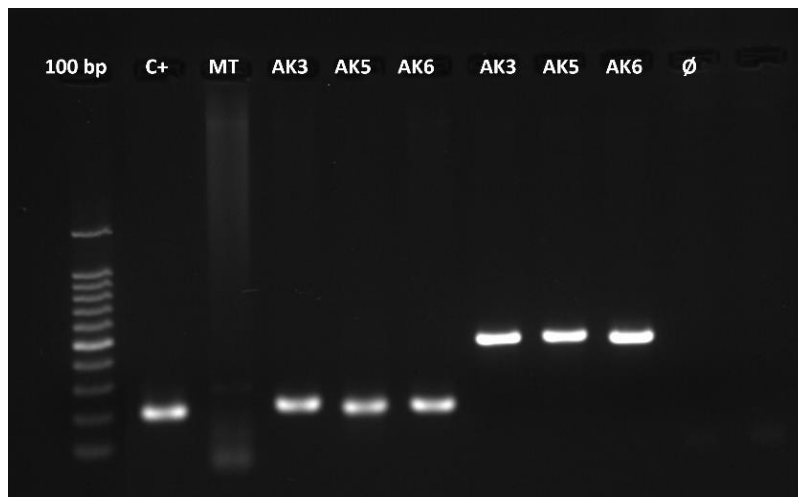


Figura 7 – Produtos de amplificação de fragmentos de 190 pb do gene da Arginina quinase (*AK*) nas linhagens AK3, AK5 e AK6 com *primers* específicos analisados em gel 1% agarose. As primeiras canaletas representam a amplificação empregando primers específicos de *AK*, seguido da amplificação das mesmas amostras utilizando um *primer* sentido promotor 35S juntamente com um iniciador reverso específico do gene alvo. Nomes na canaleta designam cada evento de transformação. Canaletas designadas com o mesmo nome pertencem ao mesmo evento de transformação. C+ controle positivo (vetor de transformação pGEM-T com sequência de *AK*, MT (Micro-Tom) não transgênico, Ø sem DNA e 100 bp marcador molecular de 100 pares de base.

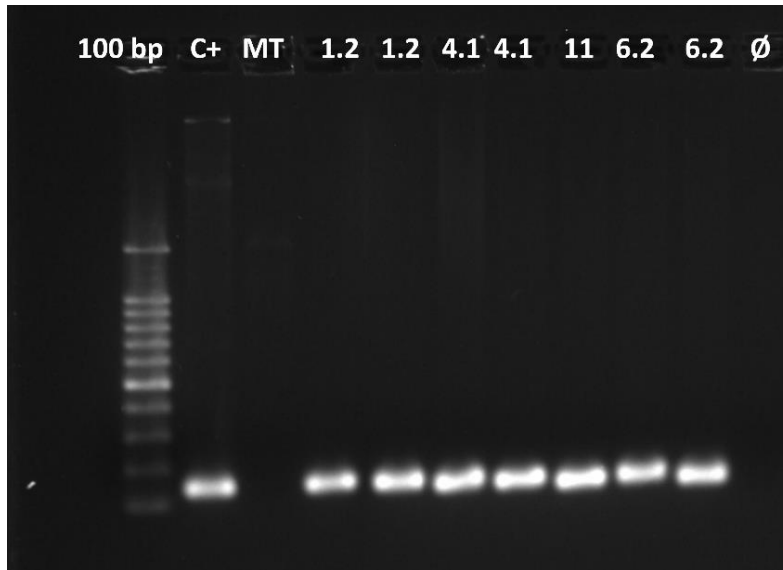


Figura 8 – Produtos de amplificação de fragmentos de 139 pb do gene da *V-ATPase A* nas linhas transgênicas *V-ATPase* 1.2, 4.1, 6.2 e 11 com *primers* específicos do gene analisados em gel 1% agarose corado com SYBR® Gold (Thermo Fisher Scientific). Os números na canaleta designam cada evento de transformação. C+ controle positivo (vetor de transformação), MT (Micro-Tom) não transgênico, Ø sem DNA e 100bp marcador molecular de 100 pares de base.

Após a confirmação por amplificação enzimática, foi realizado a análise de expressão dos transcritos transgênicos por RT-qPCR para analisar se os genes estavam de fato sendo expressos nos eventos e em quantidade de forma a selecionar as linhas que mais expressavam. A análise de RT-qPCR demonstrou que as linhagens *AK* e *V-ATPase A* selecionadas estavam expressando moléculas de dsRNA para os respectivos genes. Analisando os níveis de expressão, verificou-se que a linhagem *AK6* apresentou estatisticamente maior valor de expressão (Figura 9), e dentro das linhagens *V-ATPase A*, a 1.2, 4.1 e 6.2 apresentaram maior nível de expressão (Figura 10). No estudo de Camargo et al. (2016), os eventos *AK3*, *AK5* e *AK6* apresentaram bandas com intensidade semelhante na avaliação de expressão do gene via RT-PCR (não quantitativo). Aqui foi possível diferenciar a expressão entre os eventos por meio de RT-qPCR. De forma semelhante, foi demonstrado também a variação da expressão dos eventos *V-ATPase A*.



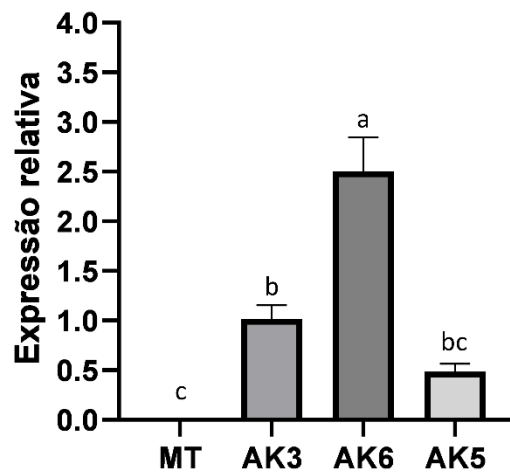


Figura 9 - Expressão relativa do gene *AK* em plantas de Micro-tom transgênicas, usando o tratamento AK5 como normalizador. As colunas representam a expressão relativa média  $\pm$  erro ( $n=5$ ). Letras diferentes mostram diferenças significativas entre as linhagens de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Gene de actina utilizado como gene de referência.

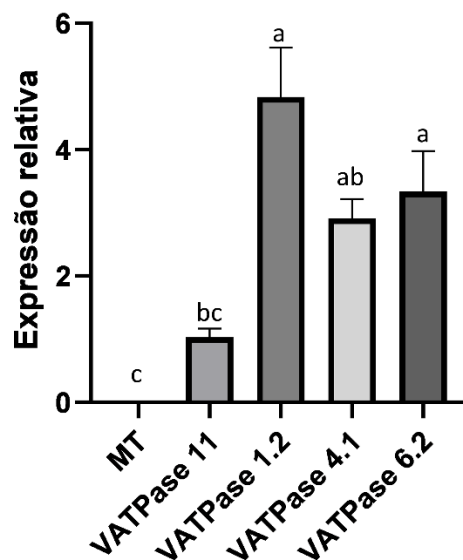


Figura 10 - Expressão relativa do gene *V-ATPase A* em plantas de Micro-Tom transgênicas nos eventos VATPase 11, 1.2, 4.1 e 6.2. Usando o tratamento VATPase 11 como normalizador. As colunas representam a expressão relativa média  $\pm$  erro ( $n=5$ ). Letras diferentes mostram diferenças significativas entre as linhagens de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Gene de actina utilizado como gene de referência.

#### 4.2.2 Alimentação da *T. absoluta* nos eventos transgênicos

Depois de confirmar a presença e expressão dos transgenes nos eventos Micro-Tom, seguiu-se com a avaliação da entrega de dsRNA para *T. absoluta* utilizando o método otimizado de três lagartas por folha. Desta vez, selecionamos duas folhas por planta para aumentar o número de réplicas biológicas, obtendo um  $n$  maior, de 72 lagartas por evento. Foram realizados dois ensaios de dano foliar com plantas transgênicas. O primeiro para o gene *AK* composto de três tratamentos, duas linhagens *AK* (*AK6* e *AK3*) e o controle Micro-Tom não transgênico (*MT*), e o segundo para o gene *V-ATPase A*, composto de cinco tratamentos, quatro linhas transgênicas (*VATPase 1.2*, *VATPase 4.1*, *VATPase 6.2*, *VATPase 11*), mais o controle Micro-tom não transgênico (*MT*).

O ensaio de dano foliar com Micro-Tom transgênico *AK* demonstrou que o evento *AK3* apresentou estatisticamente menor dano de área foliar consumida por lagartas de *T. absoluta* aos 12 dias após início da alimentação, apresentando área foliar média consumida de 4,62 cm<sup>2</sup>, enquanto o evento *AK6* e o controle Micro-tom apresentaram 5,79 e 6,78 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Resultados semelhantes também foram obtidos por Camargo et al. (2016) com diminuição do dano foliar analisado visualmente aos 7 dias após início da alimentação em folhas de transgênico *AK* na geração  $T_0$  entregues a *T. Absoluta*. No trabalho de Camargo et al. (2016), foi utilizado uma única planta  $T_0$  para como prova de conceito, já os resultados deste trabalho foram em plantas na geração  $T_3$  com mais réplicas em eventos homozigotos.

Os pesos médios das lagartas aos 12 dias após o início da alimentação foram inferiores nos tratamentos 4,56 (*AK6*) e 4,55 mg (*AK3*) em relação ao controle que obteve 4,72 mg (*MT*), porém não apresentando diferença estatística significativa. Da mesma forma, o peso de pupa obtido 24 h após formação foi inferior para os eventos *AK6* (3,92 mg) e *AK3* (3,89 mg) em relação ao controle *MT* (4,00 mg), mas assim como o peso de lagartas, não apresentou diferença estatística significativa.

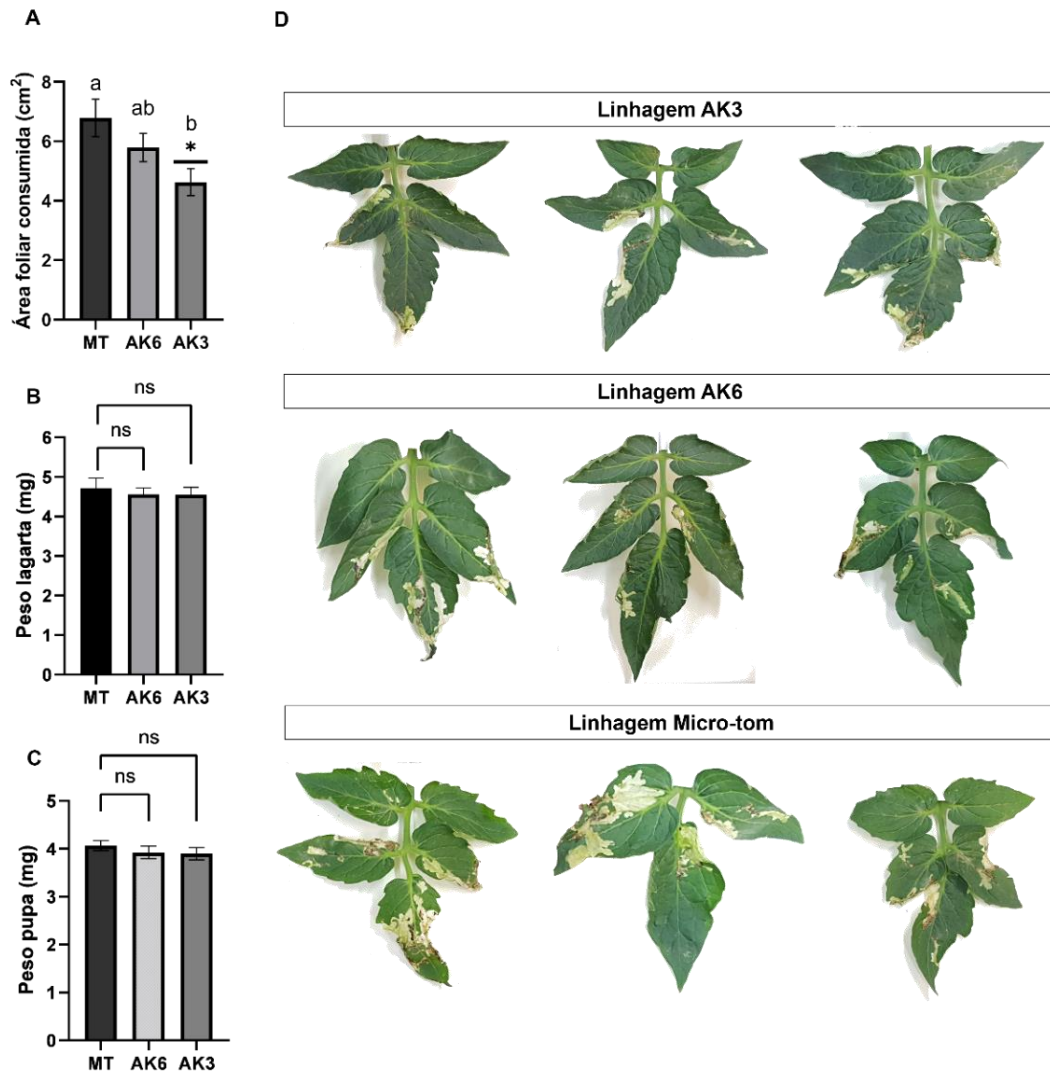


Figura 11 – Avaliação de parâmetros biológicos de lagartas de *Tuta absoluta* e dano nos ensaios de alimentação de eventos transgênicos AK. A) Valores de área foliar consumida (cm<sup>2</sup>) aos 12 dias de alimentação nas linhagens transgênicas (AK6 e AK3) e no controle Micro-tom (MT). B) Peso das lagartas aos 12 dias de alimentação. C) Peso de pupas 24 h após formação. Barras dos gráficos (A,B,C) representam médias  $\pm$  erro ( $n=72$ ). Médias dos tratamentos seguidas de (\*) e letras diferentes mostram diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). ns não significativo. D) Imagens representativas de folhas aos 12 dias de alimentação.

O ensaio de dano com tomateiro Micro-Tom transgênico V-ATPase demonstrou que o evento VATPase 4.1 apresentou significativamente a menor área foliar consumida pelas lagartas de *T. absoluta* aos 12 dias de alimentação, apresentando área foliar média consumida de 3,24 cm<sup>2</sup>, enquanto o controle 'Micro-Tom' apresentou 4,47 cm<sup>2</sup> de área foliar consumida. Tais resultados também são semelhantes ao descrito para ensaio usando folíolos de eventos T<sub>0</sub> transgênicos V-ATPase A entregues a *T. absoluta*, que apresentaram menor herbivoria por análise visual das folhas (CAMARGO et al., 2016).

O peso de lagarta aos 12 dias de alimentação em eventos Micro-Tom transgênico V-ATPase corroborou com os dados de área foliar obtidos, demonstrando um peso de lagarta menor para o tratamento VATPase 4.1. Porém, não houve diferenças estatística significativas em relação ao controle MT. Os pesos obtidos foram de 4,72 (MT), 4,33 (VATPase 1.2) e 3,89 mg (VATPase 4.1).

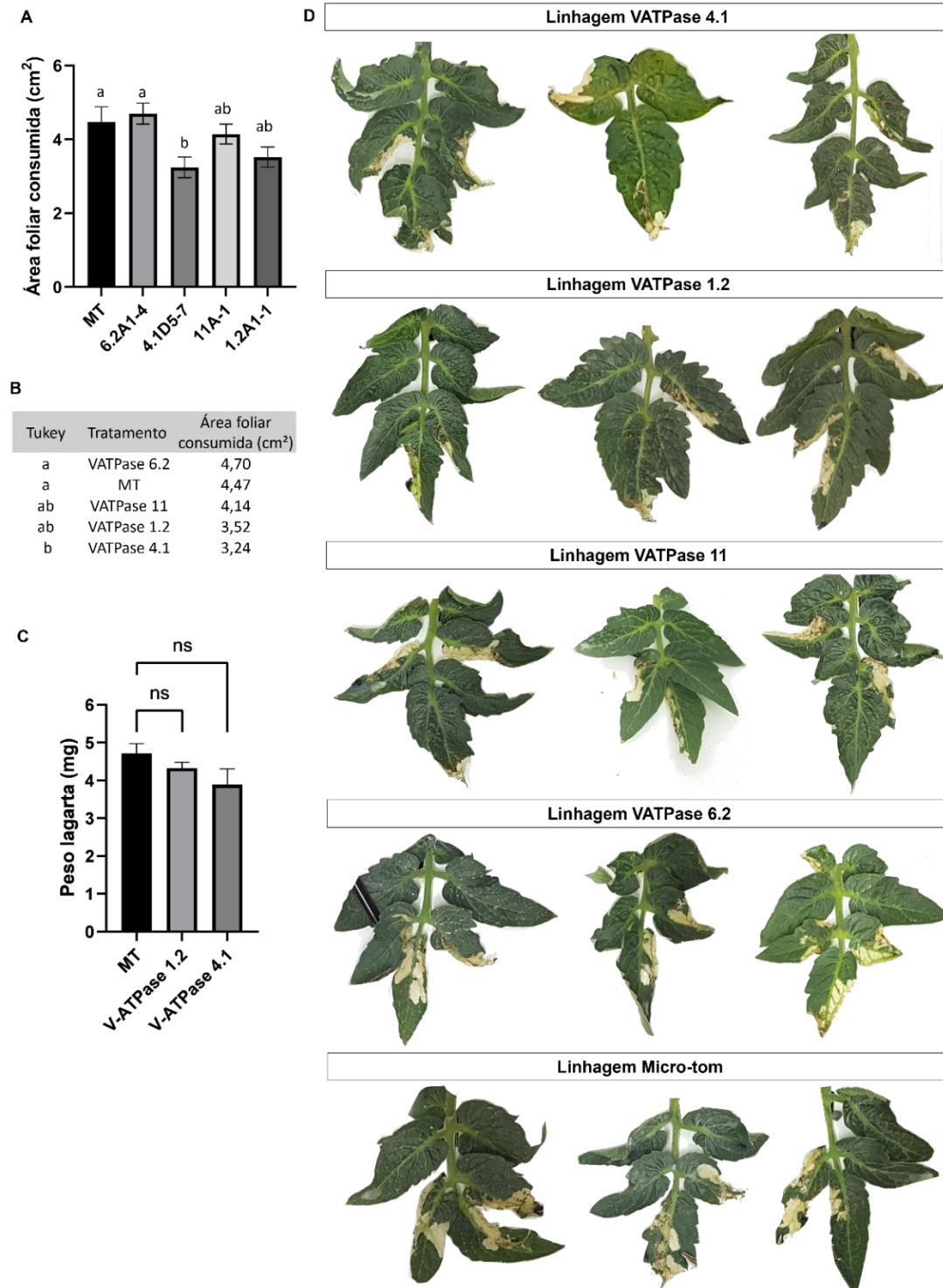


Figura 12 –Parâmetros biológicos e dano observados nos ensaios de alimentação em eventos transgênicos *V-ATPase A* por *Tuta absoluta* em. A) Área foliar consumida (cm<sup>2</sup>) aos 12 dias de alimentação nas linhagens transgênicas *V-ATPase A* e no controle Micro-Tom (MT). B) Valores médios de área foliar consumida pelas lagartas aos 12 dias de alimentação. C) Peso das lagartas aos 12 dias de alimentação. Barras dos gráficos (A,C) representam médias  $\pm$  erro ( $n=72$ ). Médias dos tratamentos seguidas de letras diferentes mostram diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). ns não significativo. D) Folhas das linhagens ou eventos transgênicos aos 12 dias de alimentação.

Os resultados demonstraram que plantas transgênicas de RNAi expressando dsRNA para os genes alvos *V-ATPase A* (evento 4.1) e *AK* (evento AK3) apresentaram uma redução na herbivoria por *Tuta absoluta*. Mas, não houve diferença significativa para os parâmetros biológicos avaliados nos insetos, como o peso de lagartas e de pupa nos testes realizados. No entanto, os genes *V-ATPase A* e *AK* são descritos como fundamentais para o metabolismo e homeostase em lepidópteros, afetando o desenvolvimento, muda e sobrevivência. Assim, o resultado da diminuição da herbivoria pode ser um ponto inicial para demonstrar o efeito das plantas transgênicas de RNAi para os genes *AK* e *V-ATPase* na *T. absoluta* (QI et al., 2015; LI; XIA, 2012; FORGAC, 2007; KOLA et al., 2015).

#### 4.2.3 Ensaio de silenciamento gênico

Visando avaliar o efeito da oferta de dsRNA pelas plantas transgênicas de RNAi dos diferentes eventos *AK* e *V-ATPase A* sobre as lagartas de *T. absoluta* foram realizados ensaios para estimar o silenciamento dos genes alvos (*AK* ou *V-ATPase*) nas lagartas. Foram empregados dois eventos de cada um dos genes alvos, sendo selecionados os eventos que apresentaram o melhor controle da herbivoria de *T. absoluta*, os eventos *AK3*, *AK6*, *VATPase 4.1* e *VATPase 1.2*.

A expressão relativa dos genes *AK* e *V-ATPase* de lagartas de *T. absoluta* alimentadas com plantas transgênicas foi avaliada via RT-qPCR em amostras coletadas aos 2, 4 e 6 dias após início da alimentação (Figura 13). A expressão do gene *AK* foi reduzida significativamente aos 4 dias de alimentação em lagartas alimentadas na linhagem *AK3* (Figura 13). Aos 2 e 6 dias de alimentação, as lagartas apresentaram valores médios de expressão mais baixos que o controle MT, no entanto não apresentou diferença estatística. Já as lagartas alimentadas na linhagem *AK6*, houve um aumento significativo não esperado dos transcritos de *AK* aos 6 dias de alimentação, enquanto que aos 2 e 4 dias de alimentação, não houve diferença significativa entre as expressões, sendo que aos 4 dias de alimentação houve um valor de expressão média ligeiramente menor que o controle, mas não significativo (Figura 13B).

Já as lagartas alimentadas em folhas das linhagens *V-ATPase A*, tanto no evento 4.1 e 1.2 apresentaram valores de expressão média relativa do gene menores do que lagartas alimentadas no controle MT (Figura 13C e D). Para as lagartas

alimentadas nas folhas do evento *V-ATPase* 1.2 houve diferença estatística aos 6 dias de alimentação. Lagartas alimentadas no evento *V-ATPase* 4.1, nenhuma média diferiu estatisticamente do controle não transgênico.

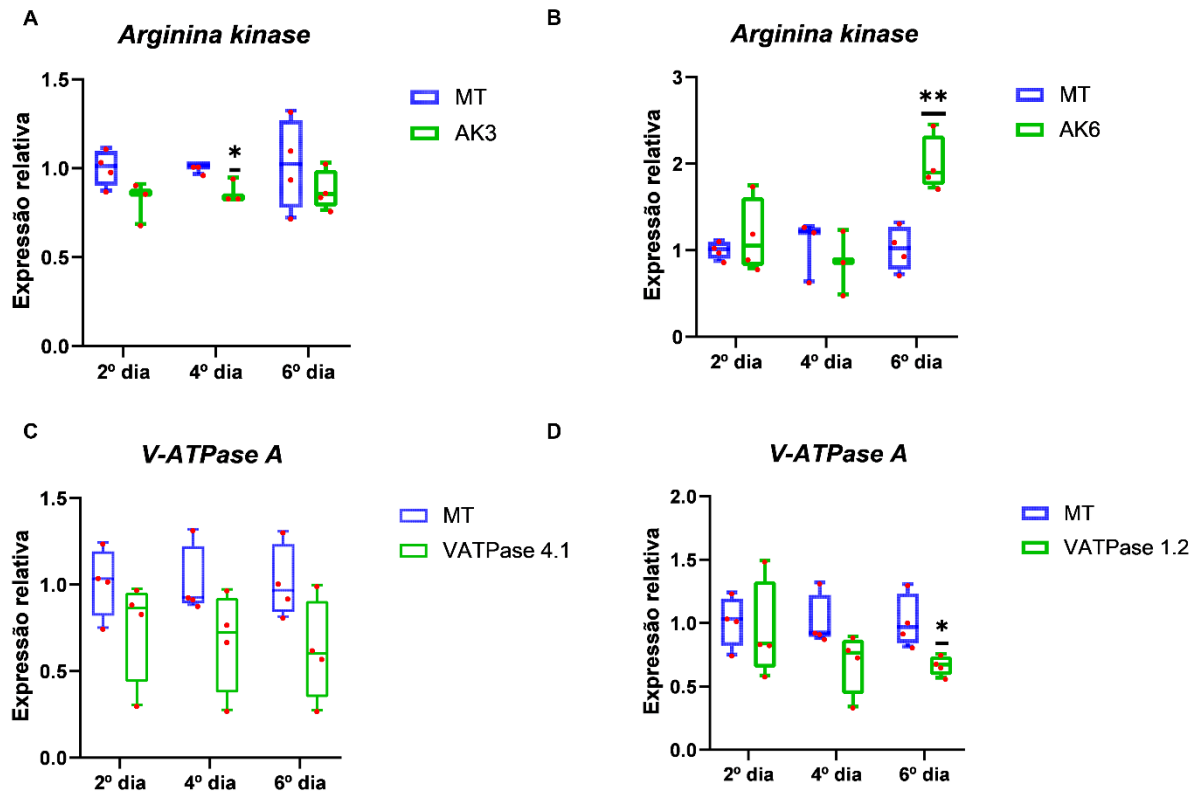


Figura 13 - Expressão relativa dos gene alvos *V-ATPase A* e *AK* em larvas de *Tuta absoluta* (n=20) após alimentação de 2, 4 e 6 dias em plantas transgênicas de RNAi. (A) Arginina quinase linhagem AK3; (B) Arginina quinase linhagem AK6; (C) *V-ATPase A* linhagem 4.1; (D) *V-ATPase A* linhagem 1.2. As colunas representam a expressão relativa média  $\pm$  erro (n=4). Médias dos tratamentos seguidas de (\*) mostram diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste *t* ( $p \leq 0.05$ ). (\*\*) mostram diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste *t* ( $p \leq 0.01$ ). (ns) não significativo.

### 4.3 Entrega de dsRNA sintético

O dsRNA sintético consiste em uma das formas de entrega para gerar o silenciamento de transcritos alvos nos organismos, e representa uma nova classe de biopesticida para o controle de insetos (Rodrigues et al., 2021). Há empresas que desenvolveram tecnologia para produção em escala de dsRNA a custos competitivos e estão desenvolvendo este mercado. A partir disso, buscamos avaliar o efeito de

moléculas sintéticas de dsRNA direcionadas para genes alvos de *T. absoluta*, investigando qual seria a forma mais adequada de entrega desses dsRNAs sintéticos. As moléculas de dsRNA foram sintetizadas pela empresa RNA Greentech LLC, Texas, EUA.

Com base nos resultados obtidos em ensaios anteriores deste trabalho, e no estudo realizado por Camargo et al. (2015; 2016) e Bento et al. (2019), os genes *AK* e *V-ATPase A* que apresentaram bons resultados no silenciamento dos genes de *T. absoluta*, afetando o desenvolvimento e herbivoria de lagartas de *T. absoluta*. Com isso, os fragmentos dos genes *AK* e *V-ATPase A* inseridos no vetor de construção transformados por Camargo et al. (2016) em tomateiro Micro-Tom foram os mesmos fragmentos utilizados para a síntese de dsRNA sintético e entrega a *T. absoluta*.

Os dsRNA sintéticos foram sintetizados pela empresa RNA Greentech e enviados ao Brasil, e a qualidade dos dsRNA (*V-ATPase A*, *AK* e *GFP*) foi confirmada em gel 1% agarose corado com brometo de etídeo para posteriormente realizar os ensaios.

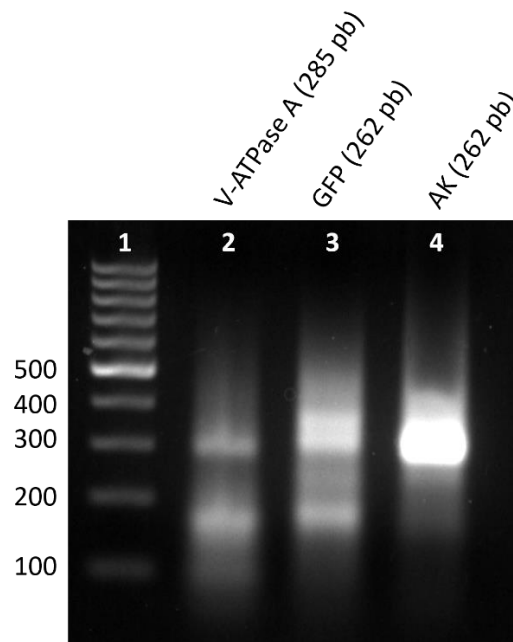


Figura 14 – Qualidade do dsRNA *V-ATPase A* (2), *GFP* (3) e *AK* (4) em gel 1%, corado com brometo de etídeo. (1) marcador molecular de DNA de 100 pares de base.



O primeiro ensaio foi conduzido empregando a aplicação de doses crescentes de dsRNA sintético nu (7,14; 14,3; 71,43 e 142,9 ng/ $\mu$ L) mais adjuvante Silwet® L-77 0,03% para melhor espalhabilidade sobre folíolos de tomateiro 'Santa Clara' no volume de 80  $\mu$ l por folíolo com auxílio de uma pipeta. Após 4 h, foram inoculadas lagartas recém eclodidas por folíolo. Esse ensaio não resultou em diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados, área foliar consumida, peso de lagarta e mortalidade. O objetivo da aplicação via pipeta era simular uma aplicação em campo de maneira controlada, sabendo exatamente a quantidade de dsRNA que havia sido colocado por folíolo. Como não houve nenhuma diferença entre os tratamentos e controle (água), foi testado uma outra forma de entrega. Devido a *T. absoluta* se alimentar do mesófilo foliar da folha, foi discutida a possibilidade do dsRNA ficar superficialmente na folha quando aplicado via pipeta, e não ter apresentado efeito sobre a *T. absoluta*. Os tecidos vegetais possuem muitas barreiras à entrada de ácidos nucleicos estranhos e aplicados topicamente, como camada lipofílica recobrando a epiderme da folha impedindo absorção de água e solutos, e a degradação por nucleases (BENNETT et al., 2020). Essas barreiras podem ter influenciado no insucesso do resultado de aplicação via pipeta. A partir disso, foi testado outra forma de entrega das moléculas de dsRNA.

No segundo ensaio foi realizado a entrega de dsRNA por meio de absorção de folíolos de tomate 'Santa Clara' destacados. Os folíolos dispostos em tampas de tubo Falcon absorveram dsRNA diluídos em água Milli-Q. Foram testadas quatro doses de dsRNA total por folíolo (1, 2, 4 e 8  $\mu$ g) para cada gene alvo (*AK* e *V-ATPase A*). Após 6 dias de alimentação de lagartas de *T. absoluta* nos folíolos, foi possível observar menor herbivoria nos tratamentos que absorveram dsRNA *AK* nas doses de 2 e 4  $\mu$ g em relação ao controle com água, e na dose de 4  $\mu$ g em relação ao controle com dsRNA GFP (Figura 13 – A). Resultados como este de menor herbivoria também foram obtidos em outro estudo com absorção de dsRNA *AK* na dose de 5  $\mu$ g, constatado por avaliação visual (CAMARGO et al., 2016). Em folíolos tratados com dsRNA *V-ATPase A* foi observada a diminuição significativa da herbivoria nas doses de 1 e 4  $\mu$ g em relação ao controle com água e na dose de 1  $\mu$ g em relação ao controle com dsRNA GFP (Figura 13 – B). Os dsRNA podem ser transportados pelo fluxo do xilema do pecíolo da planta para o resto da planta, e isso pode ter colaborado para o efeito do dsRNA na *T. absoluta* (DALAKOURAS et al., 2018).

Ainda na avaliação dos dados, a variação da área foliar consumida (Figura 14 – C) não apresentou diferenças estatísticas entre as doses dentro de um mesmo tratamento, exceto o tratamento GFP apresentando variação da dose de 2 ug em relação a dose de 4 e 8 ug. Mas é possível identificar nos tratamentos AK e V-ATPase A uma menor área foliar consumida em relação ao controle água e GFP. E também que a área foliar consumida entre os controles água e GFP não apresentam diferenças significativas, exceto na dose 2ug (Figura 14 – D), que pode ser relacionado a um certo efeito que dsRNA não alvos podem causar (NUNES et al., 2013).

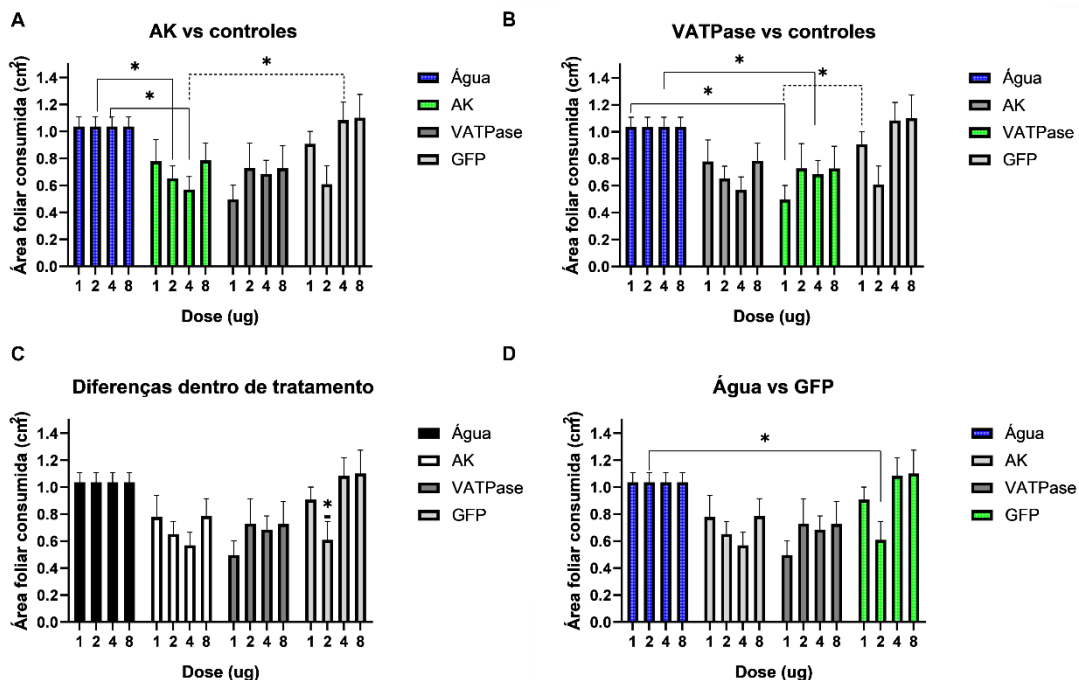


Figura 15 – Área foliar consumida por lagartas de *Tuta absoluta* em folíolos de tomate Santa Clara que absorveram doses crescente de dsRNA de fragmentos de V-ATPase A, AK e controle dsRNA-GFP e Água. (A) Comparação do tratamento AK com controles GFP e água; (B) Comparação do tratamento V-ATPase A com controle GFP e água; (C) Comparação das doses dentro de cada tratamento; (D) Comparação dos controles GFP e água. As colunas representam a área foliar média consumida  $\pm$  erro ( $n=10$ ). Médias dos tratamentos seguidas de (\*) mostram diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste  $t$  ( $p \leq 0.05$ ). (ns) não significativo.

O dsRNA sintético possui grande potencial de uso como bioinseticida, com resultados promissores no controle de pragas. Foi demonstrado o primeiro biopesticida à base de RNAi aplicado exogenamente, produzido por uma plataforma de produção de dsRNA livre de células, para o controle do besouro *Leptinotarsa decemlineata* (RODRIGUES et al., 2021).

O resultado do ensaio com dsRNA sintético conseguiu demonstrar que esses dsRNA tem efeito no controle de herbivoria de *T. absoluta*, podendo ser aprimorado para o a proteção do cultivo do tomateiro. Além de reafirmar a utilidade de folíolos destacados para a entrega de dsRNA via absorção peciolar.

## 5 CONCLUSÃO

- A metodologia de três lagartas por planta em tomateiro Micro-Tom apresentaram os melhores resultados para medição do dano foliar (ou área foliar consumida), e mais próximos de viabilidade larval e duração da fase larval comparada a valores encontrados na literatura avaliados em plantas de tomateiro Santa Clara, cultivar onde a *T. absoluta* se desenvolve melhor.

- A metodologia de três lagartas por planta em tomateiro Micro-Tom transgênicos para *V-ATPase A* e *AK* conseguiu detectar diferenças significativas de área foliar consumida entre os diferentes eventos transgênicos, apresentando menor herbivoria nos eventos AK3 e VATPase 4.1, 1.2 e 11. Confirmando também que a entrega de plantas transgênicas de RNAi pode afetar no consumo foliar. E também causou silenciamento dos genes alvos em *T. absoluta* aos 4 dias de alimentação de lagartas no evento AK3 e aos 6 dias de alimentação no evento VATPase 1.2. No entanto, não apresentou diferença estatística significativa na avaliação de parâmetros biológicos da *T. absoluta* como peso de lagarta e peso de pupa quando alimentadas com os mesmos eventos *V-ATPase A* e *AK*.

- Os dsRNA sintetizados livre de células (sintéticos) entregues via absorção peciolar em folíolos destacados de tomateiro Santa Clara acarretaram redução na herbivoria de *Tuta absoluta*. Demonstrando que a entrega dessas moléculas pode ser eficiente para a proteção de plantas.

## REFERÊNCIAS

ANGELOTTI-MENDONÇA, J. et al. Knockdown of calreticulin, laccase, and Snf7 Genes Through RNAi Is Not Effective to Control the Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Lividae). **Journal of Economic Entomology**, v. 113, n. 6, p. 2931–2940, 2020.

ARAKANE, Y. et al. The Tribolium chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. **Insect Molecular Biology**, v. 14, n. 5, p. 453-463, 2005.

AYNALEM, B. et al. Isolation, molecular characterization and pathogenicity of native *Bacillus thuringiensis*, from Ethiopia, against the tomato leafminer, *Tuta absoluta*: Detection of a new high lethal phylogenetic group | Elsevier Enhanced Reader. **Microbiological Research**, art. 126802, 2021. doi: 10.1016/j.micres.2021.126802.

BANSAL, R.; MICHEL, A. P. Core RNAi Machinery and Sid1, a Component for Systemic RNAi, in the Hemipteran Insect, *Aphis glycines*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3786–3801, 2013.

BARRIENTOS, Z. R. et al. Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 25, n. 3 p. 133-137, 1998.

BAUTISTA, M. A. M. et al. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 38–46, 2009.

BELLÉS, X. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 111–128, 2010.

BEN-AMAR, A. et al. Reverse Genetics and High Throughput Sequencing Methodologies for Plant Functional Genomics. **Current Genomics**, v. 17, n. 6, p. 460-475, 2016.

BENTO, F. M. et al. Gene silencing by RNAi via oral delivery of dsRNA by bacteria in the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science**, v. 76, n. 1, p. 287–295, 2020.

BERNHARDT, H. S.; TATE, W. P. Primordial soup or vinaigrette: Did the RNA world evolve at acidic pH? **Biology Direct**, v. 7, art. 4, 2012.

BIONDI, A; GUEDES, R.; WAN, F. Ecology, Worldwide Spread, and Management of the Invasive South American Tomato Pinworm, *Tuta absoluta*: Past, Present, and Future. **Annual Review of Entomology**, v. 63, p. 239-258, 2018.

BLANDIN, S. A. et al. Dissecting the genetic basis of resistance to malaria parasites in *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 326, n. 5949, p. 147–150, 2009.

BOGORNÍ, P. C.; CARVALHO, G. S. Biologia de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em diferentes cultivares de *Lycopersicon esculentum* Mill. **Bioikos**, v. 20, n. 2, p. 49-61, 2006.

BOGORNÍ, P. C.; SILVA, R. A. DA; CARVALHO, G. S. Consumo de mesofilo foliar por *Tuta absoluta* (Meyrick, 1971) (Lepidoptera: Gelechiidae) em três cultivares de *Lycopersicon esculentum* Mill. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 7–11, 2003.

BOISSON, B. et al. Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. **FEBS Letters**, v. 580, n. 8, p. 1988-1992, 2006.

BOLFE, L. E. et al. **Visão 2030**: o futuro da agricultura brasileira. Brasília, DF: Embrapa, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/visao/o-futuro-da-agricultura-brasileira>>. Acesso em: 15 jan. 2022.

BOTTEGA, D. B. et al. Resistant and susceptible tomato genotypes have direct and indirect effects on *Podisus nigrispinus* preying on *Tuta absoluta* larvae. **Biological Control**, v. 106, p. 27-34, 2017.

BROWN, S. J. et al. Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. **Evolution & Development**, v. 1, n. 1, p. 11–15, 1999.

BURAND, J. P.; HUNTER, W. B. RNAi: Future in insect management. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. S68-74, 2013. doi: 10.1016/j.jip.2012.07.012.

CAMARGO, R. A. et al. De novo transcriptome assembly and analysis to identify potential gene targets for RNAi-mediated control of the tomato leafminer (*Tuta absoluta*). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, art. 635, 2015.

CAPARROS MEGIDO, R. C.; HAUBRUGE, E.; VERHEGGEN, F. J. Pheromone-based management strategies to control the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). A review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 17, p. 475-482, 2013.

CAPPELLE, K. et al. The involvement of clathrin-mediated endocytosis and two Sid-1-like transmembrane proteins in double-stranded RNA uptake in the Colorado potato beetle midgut. **Insect Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 315-323, 2016.

CHICAS, A.; MACINO, G. Characteristics of post-transcriptional gene silencing. **EMBO Reports**, v. 2, n. 11, p. 992–996, 2001.

CIFUENTES, D.; CHYNOWETH, R.; BIELZA, P. Genetic study of Mediterranean and South American populations of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Povolny, 1994) (Lepidoptera: Gelechiidae) using ribosomal and mitochondrial markers. **Pest Management Science**, v. 67, n. 9, p. 1155-1162, 2011.

DALMAY, T. et al. An RNA-dependent RNA polymerase gene in arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. **Cell**, v. 101, n. 5, p. 543-553, 2000.

DE ANDRADE, E. C.; HUNTER, W. B. RNA Interference – Natural Gene-Based Technology for Highly Specific Pest Control (HiSPeC). In: ABDURAKHMONOV, I. (ed.). **RNA Interference**. London: IntechOpen, 2016. doi: 10.5772/61612

DE CASSIA, M.; COELHO, F.; FRANCA, F. H. Biologia, quetotaxia da larva e descricao da pupa e adulto da Traca do Tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, p. 129-135, 1987.

DESNEUX, N. et al. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. **Journal of Pest Science**, v. 83, n. 3, p. 197–215, 2010.

DOERING-SAAD, C. et al. Use of aphid stylectomy and RT-PCR for the detection of transporter mRNAs in sieve elements. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 369, p. 631–637, 2002.

DOWNWARD, J. RNA interference. **BMJ**, v. 328, n. 7450, p. 1245–1248, 2004.

ELBASHIR, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 494–498, 2001.

FABRICK, J. A.; KANOST, M. R.; BAKER, J. E. RNAi-induced silencing of embryonic tryptophan oxygenase in the Pyralid moth, *Plodia interpunctella*. **Journal of Insect Science**, v. 4, art. 15, 2004. doi: 10.1093/jis/4.1.15.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806–811, 1998.

GALARZA, J. Laboratory assessment of some solanaceous plants. Possible food-plants of the tomato moth *Scrobipalpula absoluta* (Meyr.) (Lepidoptera: Gelechiidae). **IDIA**, n. 421/424, p. 30-32, 1984.

GIUSTOLIN, T. A. et al. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) Criada em Dois Genótipos de Tomateiro Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. to *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) Reared on Two Genotypes of Tomato. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 417–421, 2001.

GOTO, A.; KADOWAKI, T.; KITAGAWA, Y. *Drosophila* hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. **Developmental Biology**, v. 264, n. 2, p. 582–591, 2003.

GROVER, S.; JINDAL, V.; BANTA, G. RNA interference mediated knockdown of juvenile hormone esterase gene in *Bemisia tabaci* (Gennadius): Effects on adults and their progeny. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 22, n. 1, p. 56–62, 2019.

GU, J. et al. Development of an efficient recombinant mosquito densovirus-mediated RNA interference system and its preliminary application in mosquito control. **PloS One**, v. 6, n. 6, e21329, 2011.

GUAN, R. B. et al. A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 16, p. 6011–6021, 2018.

GUEDES, R. N. C. et al. Insecticide resistance in the tomato pinworm *Tuta absoluta*: patterns, spread, mechanisms, management and outlook. **Journal of Pest Science**, v. 92, p. 1329–1342, 2019.

GUILLEMAUD, T. et al. The tomato borer, *Tuta absoluta*, invading the Mediterranean Basin, originates from a single introduction from Central Chile. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, art. 8371, 2015.

HADDI, K. et al. Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the voltage-gated sodium channel of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 7, p. 506-513, 2012.

HARIZANOVA, V.; STOEVA, A.; MOHAMEDOVA, M. Tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) – first record in Bulgaria. **Agricultural Science and Technology**, v. 1, n. 3, p. 95-98, 2009.

HARRISON, J. F. Insect acid-base physiology. **Annual review of Entomology**, v. 46, p. 221-250, 2001.

HEGEDUS, D. et al. New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 285-302, 2009.

HINAS, A.; WRIGHT, A. J.; HUNTER, C. P. SID-5 Is an Endosome-Associated Protein Required for Efficient Systemic RNAi in *C. elegans*. **Current Biology**, v. 22, n. 20, p. 1938–1943, 2012.

HUTVAGNER, G.; SIMARD, M. J. Argonaute proteins: Key players in RNA silencing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 22–32, 2008.

HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 3, p. 227-235, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, 2021a. Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag\\_2021\\_set.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2021_set.pdf)>. Acesso em: 11 out. 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **PAM 2020**: valor da produção agrícola nacional cresce 30,4% e chega a R\$ 470,5 bilhões, recorde da série. Rio de Janeiro: IBGE, Agência de Notícias, 2021b. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/31672-pam-2020-valor-da-producao-agricola-nacional-cresce-30-4-e-chega-a-r-470-5-bilhoes-recorde-da-serie>>. Acesso em: 2 nov. 2021.



JOGA, M. R. et al. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: What we know so far. **Frontiers in Physiology**, v. 7, art. 553, 2016. doi: 10.3389/fphys.2016.00553

JOSE, A. M. et al. Conserved tyrosine kinase promotes the import of silencing RNA into *Caenorhabditis elegans* cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 109, n. 36, p. 14520–14525, 2012.

KAOUD, H. A. Alternative methods for the control of *Tuta absoluta*. **Global Journal of Multidisciplinary and Applied Sciences**, v. 2, n. 2, p. 41-46, 2014.

KATOCH, R.; THAKUR, N. Insect gut nucleases: a challenge for RNA interference mediated insect control strategies. **International Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, n. 8, p. 198-203, 2012.

KENNERDELL, J. R.; CARTHEW, R. W. Use of dsRNA-Mediated Genetic Interference to Demonstrate that frizzled and frizzled 2 Act in the Wingless Pathway. **Cell**, v. 95, n. 7, p. 1017–1026, 1998.

KETTING, R. F. The Many Faces of RNAi. **Developmental Cell**, v. 20, n. 2, p. 148-161, 2011.

KOCH, A.; KOGEL, K. H. New wind in the sails: Improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 7, p. 821-831, 2014.

KRECHEMER, F. DA S.; FOERSTER, L. A. *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): Thermal requirements and effect of temperature on development, survival, reproduction and longevity. **European Journal of Entomology**, v. 112, n. 4, p. 658-663, 2015.

LATORRACA, A.; SOUSA, K. V.; FORNÉS, N. S. Agrotóxicos utilizados na produção do tomate em Goiânia e Goianópolis e efeitos na saúde humana. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 19, p. 365–374, 2008.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure: structure and function. **Annual Review of Entomology**, v. 42, n. 1, p. 525–550, 1997.

LI, H. et al. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. **Plant Cell and Environment**, v. 38, n. 11, p. 2277-2285, 2015.

McEWAN, D. L.; WEISMAN, A. S.; HUNTER, C. P. Uptake of Extracellular Double-Stranded RNA by SID-2. **Molecular Cell**, v. 47, n. 5, p. 746–754, 2012.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 343–349, 2004.

MICHEREFF FILHO, M.; GUIMARAES, J. A.; MOURA, A. P. DE. **A traça-do-tomateiro no mundo**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2013. 31 p. (Documentos, 140). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/hortaliças/busca-de-publicacoes/-/publicacao/960245/a-traca-do-tomateiro-no-mundo>>. Acesso em: 7 jun. 2019.

MIHSFELDT, L. H. **Biology and thermal requirements of Tuta absoluta (Meyrick, 1917) on artificial diet**. 1998. 104 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

MIHSFELDT, L. H.; PARRA, J. R. P. Biologia de Tuta absoluta (Meyrick, 1917) em dieta artificial. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 769–776, 1999.

MILLER, S. C.; BROWN, S. J.; TOMOYASU, Y. Larval RNAi in Drosophila? **Development Genes and Evolution**, v. 218, n. 9, p. 505–510, 2008.

NANDETY, R. S. et al. Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. **Bioengineered**, v. 6, n. 1, p. 8-19, 2014. doi: 10.4161/21655979.2014.979701

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. **Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 279-289, 1990.

NEGI, S. et al. Thermal requirements of Tuta absoluta (Meyrick) and influence of temperature on its population growth on tomato. **Journal of Biological Control**, v. 34, n. 1, p. 73–81, 2020.

OBBARD, D. J. et al. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1513, p. 99–115, 2009.

PEDROSO, M. T. M. **Estudo exploratório da cadeia produtiva do tomate para a indústria**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2020. 26 p. (Documentos, 181).

PETEK, M. et al. Validating the Potential of Double-Stranded RNA Targeting Colorado Potato Beetle Mesh Gene in Laboratory and Field Trials. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, art. 1250, 2020.

PETRUK, S. et al. Transcriptional elongation of non-coding bxd RNAs promoted by the Trithorax TAC1 complex represses Ubx by a transcriptional interference mechanism. **Cell**, v. 127, n. 6, art. 1209, 2006.

PFEIFFER, D. G. et al. First Record of Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) in Senegal. **Florida Entomologist**, v. 96, n. 2, p. 661-662, 2013.

PIRES, L. M. et al. Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) e sua compatibilidade com alguns inseticidas usados na cultura do tomateiro. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 977–984, 2010.

GUEDES, R. N. C.; PICANÇO, M. C. The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. **EPPO Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 211-216, 2012.

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

RANK, A. P.; KOCH, A. Lab-to-Field Transition of RNA Spray Applications – How Far Are We? **Frontiers in Plant Science**, v. 12, art. 755203, 2021. doi: 10.3389/fpls.2021.755203.

RODITAKIS, E. et al. First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. **Journal of Pest Science**, v. 88, n. 1, 2015. doi: 10.1007/s10340-015-0643-5

RODRIGUES, T. B. et al. First Sprayable Double-Stranded RNA-Based Biopesticide Product Targets Proteasome Subunit Beta Type-5 in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). **Frontiers in Plant Science**, v. 12, art. 728652, 2021.

RODRÍGUEZ-CABRERA, L. et al. RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 11, p. 2894–2903, 2010.

SALAS GERVASSIO, N. G. et al. A re-examination of *Tuta absoluta* parasitoids in South America for optimized biological control. **Journal of Pest Science**, v. 92, p. 1343–1357, 2019.

SALEH, M. C. et al. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 8, p. 793-802, 2006.

SAN MIGUEL, K.; SCOTT, J. G. The next generation of insecticides: DsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. **Pest Management Science**, v. 72, n. 4, p. 801-809, 2016.

SANDA, N. B. et al. Biological Invasion of Tomato Leaf Miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) in Nigeria: Problems and Management Strategies. SANDA, N. B.; SUNUSI, M.; HAMISU, H. S.; WUDIL, B. S.; SULE, H.; ABDULLAHI, A. M. Biological Invasion of Tomato Leaf Miner, *Tuta absoluta* (Meyrick). **Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research**, v. 1, n. 4, p. 1–14, 2018.

SCOTT, J. G. et al. Towards the elements of successful insect RNAi. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, n. 12, p. 1212-1221, 2013.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, 9(7), 671–675, 2012.

SHI, X. et al. Modeling the structure of the Type I peritrophic matrix: Characterization of a *Mamestra configurata* intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 10, p. 1101-1115, 2004.

SIJEN, T. et al. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 465-476, 2001.

SILVA, T. B. M. et al. Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. **Crop Protection**, v. 79, p. 80-86, 2016.

SILVER, K.; COOPER, A. M. W.; ZHU, K. Y. Strategies for enhancing the efficiency of RNA interference in insects. **Pest Management Science**, v. 77, n. 6, p. 2645–2658, 2021.

SIQUEIRA, H. A. A.; GUEDES, R. N. C.; PICANCO, M. C. Cartap resistance and synergism in populations of *Tuta absoluta* (Lep., Gelechiidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 124, p. 233-238, 2000.

SUN, X. Q. et al. Glutathione S-Transferase of Brown Planthoppers (*Nilaparvata lugens*) Is Essential for Their Adaptation to Gramine-Containing Host Plants. **PloS One**, v. 8, n. 5, e64026, 2013.

TERENIUS, O. et al. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 2, p. 231-245, 2011.

TIAN, H. et al. Developmental Control of a Lepidopteran Pest *Spodoptera exigua* by Ingestion of Bacteria Expressing dsRNA of a Non-Midgut Gene. **PloS One**, v. 4, n. 7, e6225, 2009.

TOMOYASU, Y. et al. Exploring systemic RNA interference in insects: A genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. **Genome Biology**, v. 9, n. 1, res. 10, 2008. doi: 10.1186/gb-2008-9-1-r10.

TONNANG, H. E. Z. et al. Identification and risk assessment for worldwide invasion and spread of *tuta absoluta* with a focus on Sub-Saharan Africa: Implications for phytosanitary measures and management. **PloS One**, v. 10, n. 9, e0138319, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0138319

TURNER, C. T. et al. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 3, p. 383–391, 2006.

ULVILA, J. et al. Double-stranded RNA Is Internalized by Scavenger Receptor-mediated Endocytosis in *Drosophila* S2 Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 20, p. 14370–14375, 2006.

URBANEJA, A. et al. Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. **Pest Management Science**, v. 68, n. 9, p. 1215-1222, 2012.

URBANEJA, A. et al. Biology, ecology and management of the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. In: PEÑA, J. (ed.). **Potential Invasive Pests of Agricultural Crops**. Wallingford: CABI, 2013. p. 98-125.

WANG, K. et al. Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation in vivo. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 77, p. 1-9, 2016.

WEIBERG, A. et al. Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. **Science**, v. 342, n. 6154, p. 118–123, 2013.

WHANGBO, J. S.; HUNTER, C. P. Environmental RNA interference. **Trends in Genetics**, v. 24, n. 6, p. 297–305, 2008.

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

WINSTON, W. M. et al. *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 104, n. 25, p. 10565-10570, 2007.

XU, H. J. et al. Genome-wide screening for components of small interfering RNA (siRNA) and micro-RNA (MIRNA) pathways in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). **Insect Molecular Biology**, v. 22, n. 6, p. 635-647, 2013.

XU, W.; HAN, Z. Cloning and phylogenetic analysis of sid-1-like genes from aphids. **Journal of Insect Science**, v. 8, n. 1, p. 1-6. doi: 10.1673/031.008.3001 2008.

YAN, S. et al. Improving RNAi efficiency for pest control in crop species. **BioTechniques**, v. 68, n. 5, p. 283–290, 2020.

YU, N. et al. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. **Insect Science**, v. 20, n. 1, p. 4–14, 2013.

ZAPPALÀ, L. et al. Recruitment of native parasitoids by the exotic pest *Tuta absoluta* in southern Italy. **Bulletin of Insectology**, v. 65, n. 1, p. 51-61, 2012.

ZHANG, H. et al. Lepidopteran insect species-specific, broad-spectrum, and systemic RNA interference by spraying dsRNA on larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 155, n. 3, p. 218–228, 2015.

ZHANG, J. et al. Next-Generation Insect-Resistant Plants: RNAi-Mediated Crop Protection. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 871-882, 2017.