

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA  
VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**RNA DE INTERFERÊNCIA COMO ALTERNATIVA  
PARA O CONTROLE DE *Helicoverpa armigera*  
MEDIANTE SILENCIAMENTO GÊNICO**

**CÁSSIA CANZI CECCON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de mestre em Agronomia. – Área de concentração em Produção e Proteção de Plantas.

Passo Fundo, abril de 2016

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA**  
**VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**RNA DE INTERFERÊNCIA COMO ALTERNATIVA**  
**PARA O CONTROLE DE *Helicoverpa armigera***  
**MEDIANTE SILENCIAMENTO GÊNICO**

**CÁSSIA CANZI CECCON**

**Orientadora: Profa Dra. Magali Ferrari Grandó**  
**Coorientador: Prof Dr. José Roberto Salvadori**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de mestre em Agronomia – Área de concentração em Produção e Proteção de Plantas.

Passo Fundo, abril de 2016



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

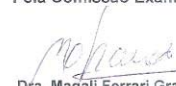
**"RNA DE INTERFERÊNCIA COMO ALTERNATIVA PARA O CONTROLE DE *Helicoverpa armigera* MEDIANTE SILENCIAMENTO GÊNICO"**

Elaborada por

Cássia Canzi Ceccon

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em  
Agronomia – Produção e Proteção de Plantas

Aprovada em: 29/04/2016  
Pela Comissão Examinadora

  
Dra. Magali Ferrari Grando  
Presidente da Comissão Examinadora  
Orientadora

  
Dr. Rogério Margis  
UFRGS

  
Dr. José Roberto Salvadori  
FAMV

  
Dra. Eunice Oliveira Calvete  
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia

  
Dra. Andréia Caverzan  
FAMV

  
Dr. Hélio Carlos Rocha  
Diretor FAMV

CIP – Catalogação na Publicação

---

- C388r    Cecon, Cássia Canzi  
          RNA de interferência como alternativa para o controle  
          de *Helicoverpa armigera* mediante silenciamento gênico /  
          Cássia Canzi Cecon. – 2016.  
          150 f. : il., color. ; 25 cm.
- Orientadora: Profa. Dra. Magali Ferrari Grando.  
          Coorientador: Prof. Dr. José Roberto Salvadori.  
          Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade  
          de Passo Fundo, 2016.
1. Lagarta. 2. Sequência de bases. 3. Biotecnologia  
          agrícola. 4. Pragas agrícolas – Controle. I. Grando, Magali  
          Ferrari, orientadora. II. Salvadori, José Roberto,  
          coorientador. III. Título.

CDU: 632.7

---

Catalogação: Bibliotecária Cristina Troller - CRB 10/1430

## BIOGRAFIA DO AUTOR

**Cássia Canzi Ceccon** nasceu em dezembro de 1992, na cidade de Espumoso, Rio Grande do Sul. Em 2010, iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de Passo Fundo - UPF, formando-se em dezembro de 2013. Em 2014, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela mesma instituição. Durante o período de graduação, trabalhou no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF com transformação genética vegetal, com ênfase no desenvolvimento de novas tecnologias para o controle de insetos. Para a obtenção do título de mestre desenvolveu, no mesmo laboratório, estudos utilizando o mecanismo de RNA de interferência (RNAi) como uma alternativa biotecnológica para o controle da lagarta *Helicoverpa armigera*.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, meus pais, Carlos e Claudete, e minhas irmãs, Francieli e Geovana, por todo o amor, apoio e incentivo durante este período e toda a minha vida.

Ao meu namorado, Gelson, pelo companheirismo, apoio, compreensão e paciência durante os melhores e piores momentos.

À minha orientadora, Prof. Dra. Magali, pela oportunidade, conselhos, ensinamentos, apoio e pelo exemplo de profissional e pessoa, além da excelente orientação. Muito obrigada.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. José Roberto Salvadori, pelos ensinamentos e contribuição para minha formação profissional.

Ao Dr. Robert George Shatters Jr. (USDA-EUA), pelo auxílio no planejamento e desenvolvimento do trabalho, discussões e ensinamentos, bem como na indicação do gene alvo do silenciamento e auxílio na produção dos RNAs dupla fita utilizados no experimento.

À Dra. Andreia Caverzan, pelas orientações referentes ao planejamento dos experimentos e análise dos dados de RT-qPCR.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, especialmente, Marília, Dielli, Tiago, Marilei e Natália, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho, companheirismo e convivência. Com vocês os problemas e dificuldades ficam menores.

À equipe do Laboratório de Entomologia, especialmente à Crislaine, pela amizade e disponibilidade.

À Universidade de Passo Fundo e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia e aos professores, pela oportunidade e ensinamentos.

À Fapergs, pela concessão da bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	16
<b>ABSTRACT</b> .....	18
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	22
2.1 <i>Helicoverpa armigera</i> .....	22
2.2.1 Biologia.....	22
2.2.2 Controle.....	28
2.2 RNA de interferência.....	31
2.3 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	45
<b>CAPÍTULO I</b> .....	50
<b>RESUMO</b> .....	50
<b>ABSTRACT</b> .....	51
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	53
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	58
2.1 Insetos.....	58
2.2 Estádio de desenvolvimento e tecidos.....	60
2.3 Síntese do RNAdf do gene <i>rieske</i> .....	61
2.4 Administração oral de RNAdf do gene <i>rieske</i> .....	63
2.5 Seleção dos genes de referência candidatos e desenho dos <i>primers</i> .....	64
2.6 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	65
2.7 RT-qPCR.....	66
2.8 Análise estatística.....	67
2.9 Análise da expressão do gene alvo <i>rieske</i> .....	68
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	68
3.1 Eficiência de amplificação do PCR e perfil de amplificação dos genes de referência.....	68
3.2 Estabilidade da expressão dos genes de referência candidatos.....	71
3.2.1 Estádios de desenvolvimento larval de <i>H.</i> <i>armigera</i> .....	73
3.2.2 Tecido.....	74
3.2.3 Tratamento das larvas de 3 <sup>o</sup> ínstar com RNAdf do gene <i>rieske</i> ofertado oralmente.....	75
3.3 Perfil de expressão e silenciamento do gene alvo <i>rieske</i> .....	83
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	87



<b>CAPÍTULO II</b> .....	88
<b>RESUMO</b> .....	88
<b>ABSTRACT</b> .....	90
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	91
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	97
2.1 Insetos.....	97
2.2 Produção do RNAdf <i>rieske</i> e RNAdf de molécula teste (RNAdf-T).....	99
2.3 Experimento I.....	101
2.4 Experimento II.....	104
2.5 Coleta dos insetos para extração do RNA.....	105
2.6 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	106
2.7 RT-qPCR.....	106
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	108
3.1 Experimento I.....	108
3.1.1 Mortalidade das larvas alimentadas com diferentes doses de RNAdf <i>rieske</i> .....	108
3.1.2 Ganho de peso das larvas alimentadas com diferentes doses de RNAdf <i>rieske</i> .....	112
3.1.3 Consumo das larvas alimentadas com diferentes doses de RNAdf <i>rieske</i> .....	113
3.1.4 Desenvolvimento das larvas alimentadas com diferentes doses de RNAdf <i>rieske</i> .....	115
3.1.5 Validação do efeito da dose de 0,3 µg.cm <sup>-2</sup> de RNAdf <i>rieske</i> na mortalidade das larvas.....	117
3.2 Experimento II.....	119
3.2.1 Mortalidade das larvas alimentadas com 0,3 µg.cm <sup>-2</sup> de RNAdf <i>rieske</i> .....	119
3.2.2 Avaliação da expressão do gene <i>rieske</i> via RT-qPCR em larvas alimentadas com de RNAdf <i>rieske</i> .....	120
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	131
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	132

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I - Estabilidade de expressão de genes de referência para análise de silenciamento gênico mediado pelo RNA de interferência empregando RT-qPCR em *Helicoverpa armigera***

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	Pares de <i>primers</i> dos genes de referência e gene <i>rieske</i> utilizados para RT-qPCR. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	65
2	Estabilidade da expressão dos genes de referência candidatos de <i>Helicoverpa armigera</i> em diferentes condições bióticas, calculados pelo GeNorm, NormFinder, BestKeeper e Coeficiente de variação. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	78
3	Ranking da estabilidade dos genes de referência candidatos de <i>Helicoverpa armigera</i> calculado pelo RefFinder, considerando o experimento completo. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	79

### **CAPÍTULO II - Silenciamento do gene *rieske* pela administração oral de RNA dupla fita visando o controle do inseto-praga *Helicoverpa armigera* via RNA de interferência**

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	Pares de <i>primers</i> dos genes de referência e gene <i>rieske</i> utilizados para RT-qPCR. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	107
2	Mortalidade e mortalidade corrigida de <i>Helicoverpa armigera</i> alimentadas com três doses de RNAdf do gene <i>rieske</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	109
3	Percentual de larvas de <i>Helicoverpa armigera</i> no 4º, 5º e 6º estágio de desenvolvimento aos 15 dias de experimento com fornecimento oral de RNAdf <i>rieske</i> em diferentes doses. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	115

4	Consumo médio total das larvas de <i>Helicoverpa armigera</i> , considerando o consumo de discos foliares tratados e não tratados com RNAdf <i>rieske</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	128
5	Ganho de peso das larvas de <i>Helicoverpa armigera</i> entre os dias 6 e 12, quando a alimentação era composta por discos foliares de soja e, peso de pupa, após as larvas serem transferidas para dieta artificial sem RNAdf <i>rieske</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	129

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Processos de RNAi em insetos. Captação e processamento RNAdf na célula, amplificação dentro e entre células e efeitos moleculares e fenotípicos observados. Adaptado de Scott et al. (2013)	36
2	Tipos de RNAi. Adaptado de Lim et al., 2016.....	36
3	Via de silenciamento gênico local e sistêmico mediado por RNAdf. Adaptado de Price & Gatehouse (2008).....	38
4	Esquema do Citocromo bc1 da membrana mitocondrial indicando a localização da proteína Iron-sulfur (Fe-S) a qual é codificada pelo gene <i>rieske</i> . Adaptado de www.biotech-resourch.com.....	45

### CAPÍTULO I - Genes de referência para análise de silenciamento gênico mediado pelo RNA de interferência empregando RT-qPCR em *Helicoverpa armigera*

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Criação dos adultos de <i>Helicoverpa armigera</i> para reprodução. A) gaiolas de reprodução construídas com tubo de PVC e cobertas com tule; B) fêmea realizando a oviposição sobre o tule; C) ovos de <i>H. armigera</i> (seta). FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	59
2	Esquema da sequência de cDNA do gene <i>rieske</i> e porção do gene a partir da qual foi sintetizado o RNAdf <i>rieske</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	61
3	Eficiência de amplificação dos <i>primers</i> da <i>actina</i> , <i>ef1-<math>\alpha</math></i> , <i>GAPDH</i> e <i>rieske</i> nas diluições de 5 e 10 $\mu$ M de <i>primers</i> e 10 e 5 ng de cDNA calculada pelo programa	

	LinReg. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Nas barras está indicado o desvio padrão.....	69
4	Perfil do nível de expressão dos genes de referência de <i>Helicoverpa armigera</i> dado pelo valor do <i>Cycle Threshold</i> (Ct) de cada um dos genes testados em cada condição biótica isoladamente: estádios de desenvolvimento (A) tecidos (B) e tratamento com RNAdf do gene <i>rieske</i> (C) e, considerando o experimento total (D). FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Nas barras está indicado o desvio padrão.....	70
5	Estabilidade da expressão dos genes de referência candidatos em larvas de <i>Helicoverpa armigera</i> do 2º ao 6º instar, calculado pelo GeNorm (A), NormFinder (B), BestKeeper (C) e Coeficiente de variação (D). FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	74
6	Estabilidade da expressão dos genes de referência candidatos em larvas de <i>Helicoverpa armigera</i> no tecido digestório e no restante do corpo calculado pelo GeNorm (A), NormFinder (B), BestKeeper (C) e Coeficiente de variação (D). FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	75
7	Estabilidade da expressão dos genes de referência candidatos em larvas de <i>Helicoverpa armigera</i> submetidas ao silenciamento do gene <i>rieske</i> induzido pela alimentação com RNAdf- <i>rieske</i> calculado pelos métodos GeNorm (A), NormFinder (B), BestKeeper (C) e Coeficiente de variação (D). FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	76
8	Expressão relativa do gene <i>rieske</i> do 2º ao 6º estágio larval em <i>Helicoverpa armigera</i> no tecido digestório (A) e corporal (B). FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Colunas seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste T. Nas barras está indicado o erro padrão da média.....	84

- 9 Expressão relativa do gene *rieske* nas larvas de *Helicoverpa armigera* em 3º estágio larval alimentadas com RNAdf *rieske* e controle. Amostras do tecido digestório (A) e corporal (B). FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Colunas seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste T. Nas barras está indicado o erro padrão da média..... 85

## CAPÍTULO II - Silenciamento do gene *rieske* pela administração oral de RNA dupla fita visando o controle do inseto-praga *Helicoverpa armigera* via RNA de interferência

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1 Metodologia de alimentação das larvas de <i>Helicoverpa armigera</i> . A) as larvas foram mantidas individualizadas em placas de Petri de 5 cm de diâmetro com papel filtro umedecido. B) o RNAdf foi disponibilizado as larvas sobre discos foliares de soja. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	102
2 Dinâmica de mortalidade de <i>Helicoverpa armigera</i> alimentada com diferentes doses de RNAdf <i>rieske</i> entre o 5º e o 17º dia de experimento. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	109
3 Peso médio das larvas de <i>Helicoverpa armigera</i> alimentadas com diferentes doses de RNAdf <i>rieske</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Nas barras está representado o desvio padrão.....	112
4 Consumo médio total de <i>Helicoverpa armigera</i> alimentadas com diferentes doses de RNAdf <i>rieske</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Nas barras está representado o desvio padrão.....	113
5 Disco foliar de soja consumido pelas larvas de <i>Heliocverpa armigera</i> aos 4 dias de experimento. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	114
6 Redução do desenvolvimento de larvas de	

	<i>Helicoverpa armigera</i> alimentadas com 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ RNAdf <i>rieske</i> (A) e controle (B) no 15 <sup>o</sup> dia de experimento. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	116
7	Mortalidade das larvas de <i>Helicoverpa armigera</i> alimentadas com 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de RNAdf <i>rieske</i> aos 10 dias no experimento I de teste de dose e no experimento adicional de validação da melhor dose. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.....	118
8	Mortalidade das larvas de <i>Helicoverpa armigera</i> alimentadas com RNAdf <i>rieske</i> , e controles RNAdf-T e água ao longo do desenvolvimento larval. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. As médias diárias com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $P<0,05$ . Nas barras está indicado o desvio padrão.....	120
9	Expressão do gene <i>rieske</i> nas larvas de 3 <sup>o</sup> instar de <i>Helicoverpa armigera</i> alimentadas com RNAdf <i>rieske</i> , RNAdf-T e controle avaliadas por RT-qPCR. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Colunas com a mesma letra para cada grupo não diferem significativamente pelo teste T. Nas barras está indicado o erro padrão da média.....	121
10	Expressão do gene <i>rieske</i> nas larvas de 6 <sup>o</sup> instar de <i>Helicoverpa armigera</i> , alimentadas com RNAdf <i>rieske</i> , RNAdf-T e controle. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Colunas com a mesma letra para cada grupo não diferem significativamente pelo teste T. Nas barras está indicado o erro padrão da média.....	124
11	Mortalidade de <i>Helicoverpa armigera</i> no 2 <sup>o</sup> , 3 <sup>o</sup> e 4 <sup>o</sup> instar e quando as larvas foram postas em dieta artificial, após atingirem o 6 <sup>o</sup> estágio de desenvolvimento. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Colunas de cada estágio de desenvolvimento e dieta com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, $P<0,05$ . Nas barras está indicado o desvio padrão.....	128

**RNA DE INTERFERÊNCIA COMO ALTERNATIVA  
PARA O CONTROLE DE *Helicoverpa armigera*  
MEDIANTE SILENCIAMENTO GÊNICO**

**CÁSSIA CANZI CECCON<sup>1</sup>**

**RESUMO** – A lagarta *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada inseto-praga de culturas de importância econômica. Grupos de pesquisas têm estudado o RNA de interferência (RNAi) para silenciamento de genes vitais do inseto alvo. A redução da expressão desses genes pode causar mortalidade e afetar o desenvolvimento do inseto alvo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a habilidade do RNAdf com complementariedade à porção do gene *rieske* de *H. armigera* em induzir a resposta de RNAi e causar mortalidade, quando disponibilizado oralmente. O gene *rieske* codifica para uma proteína mitocondrial envolvida no transporte de elétrons e produção de energia. A hipótese testada foi a de que o RNAdf entra nas células epiteliais do intestino induzindo a resposta de RNAi, reduzindo a expressão do gene *rieske* e consequentemente, a produção de energia. Este efeito reduziria a habilidade das células em realizar as funções digestivas resultando na mortalidade das larvas. Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Biotecnologia Vegetal e de Entomologia da Universidade de Passo Fundo. Inicialmente, foi determinado o perfil de expressão do gene *rieske* durante o

---

<sup>1</sup> Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Produção e Proteção de Plantas.



desenvolvimento larval no tecido digestório e do restante do corpo e foram identificados os genes de referência apropriados para uso em RT-qPCR. Em seguida, foi determinada a dose de RNAdf mais efetiva na indução da mortalidade das larvas. Posteriormente, foi avaliada a ocorrência do silenciamento gênico e a sua relação com a mortalidade e o desenvolvimento das larvas. Os genes de referência mais estáveis para normalização da expressão do gene *rieske* por RT-qPCR foram *fator de alongação 1- $\alpha$*  (*efl- $\alpha$* ) e *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* (*GAPDH*). A dose de 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de RNAdf *rieske* foi mais efetiva na indução da mortalidade, redução do ganho de peso e consumo. A disponibilização, a cada dois dias, de discos foliares de soja contendo 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de RNAdf *rieske* causou a redução dos transcritos do gene *rieske* e mortalidade das larvas de *H. armigera*. Porém, quando a alimentação com discos foliares tratados com RNAdf foi intercalada com discos foliares não tratados os efeitos observados não foram similares. Esses resultados indicam que o silenciamento do gene *rieske* mediado por RNAi tem potencial para ser utilizado para controle de *H. armigera*, porém, para maior efetividade, a disponibilização do RNAdf deve ser contínua.

**Palavras-chave:** expressão gênica, gene *rieske*, RNA dupla-fita, inseto-praga

**RNA INTERFERENCE FOR *Helicoverpa armigera*  
ALTERNATIVE CONTROL BY GENE SILENCING**

**ABSTRACT** – *Helicoverpa armigera* is a pest insect of several economically important crops. Research groups have studied RNA interference (RNAi) to knock down expression of vital genes within target pests. Successful reduction of the expression of these genes can lead to mortality and affect the insect development. The objective of this work was to evaluate the ability of orally introduced double strand RNA (dsRNA) matching the *H. armigera* larvae *rieske* gene to induce an RNAi response and to cause mortality. The *rieske* gene encodes a mitochondrial protein involved in the electron transport and energy production. We hypothesize that dsRNA will enter the gut epithelial cells and induce an RNAi response that reduces *rieske* gene expression, and consequently, reduce energy production. This should reduce the cells ability to perform digestive functions resulting in larvae mortality. The experiments were performed in the Plant Biotechnology and Entomology Laboratories of the University of Passo Fundo. Initially, a profile of developmental changes in the *rieske* transcript was developed for dissected digestive tracts and whole insects and appropriated reference genes were identified for use with RT-qPCR. Second, the dsRNA dose most effective at inducing larvae mortality was determined. Subsequently, the occurrence of gene silencing and its relationship with larval mortality and development was evaluated. The RT-qPCR reference genes found to be the most stable for normalization of

*rieske* gene expression were *elongation factor 1- $\alpha$*  (*ef1- $\alpha$* ) and *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*). The *rieske* dsRNA dose of 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  was most effective at inducing larvae mortality, reducing weight gain and inhibiting leaf consumption. Delivering 0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  of dsRNA *rieske* every two days to soybean leaf discs caused a reduction in the *rieske* gene transcripts and increased *Helicoverpa armigera* larval mortality. But when the feeding of leaf discs treated with dsRNA was interrupted with untreated leaf disks similar effects were not observed. These results indicate that the RNAi mediated gene silencing of *rieske* has the potential to be used as *H. armigera* control, however for increased effectiveness, the delivery of the dsRNA must be continuous.

**Key words:** gene expression, *rieske* gene, double stranded RNA, pest insect

## 1 INTRODUÇÃO

*Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) se destaca como inseto-praga de diversas plantas de importância econômica, especialmente por atacar, preferencialmente, estruturas jovens e reprodutivas das plantas (MAMTA et al., 2016). Além disso, a polifagia e a capacidade de adaptação a diversos hospedeiros, permite a manutenção de populações a campo, inclusive durante o período de entressafra, dificultando seu controle.

As principais formas de controle são a utilização de plantas geneticamente modificadas expressando a proteína CRY e o uso de inseticidas. Porém, estudos demonstram a existência de população de lagartas resistentes a ambas tecnologias (AGGARWAL et al., 2006; DOWNES & MAHON, 2012). Dessa forma, novas alternativas de controle são requeridas para substituição ou utilização em conjunto com as tecnologias existentes atualmente.

Diversos grupos de pesquisa têm baseado seus trabalhos na utilização da estratégia de RNA de interferência (RNAi) para o silenciamento de genes vitais de insetos-praga. A estratégia é baseada na introdução de moléculas de RNA dupla-fita que são processadas pela maquinaria específica da célula e se ligam ao RNA mensageiro (RNAm) alvo, com o qual possuem complementariedade. Essa ligação resulta na degradação da fita de RNAm alvo. Se o gene alvo do silenciamento codificar uma proteína essencial para a sobrevivência do inseto alvo, a redução na expressão poderá

levar a morte ou afetar o desenvolvimento. O gene alvo do silenciamento utilizado no presente trabalho foi o gene *rieske*. Este gene codifica para uma proteína envolvida no transporte de elétrons pela mitocôndria. Dessa forma, a redução na expressão do gene *rieske* interfere na produção de energia pela célula.

Para avaliação da ocorrência e o nível de silenciamento gênico, a técnica mais utilizada é o RT-qPCR, método altamente sensível, uma das maiores vantagens de sua utilização (BUSTIN et al., 2000). Porém, a alta sensibilidade pode levar a interpretações errôneas devido a variações não específicas decorrentes da manipulação das amostras. Para eliminar estas variações são utilizados genes de referência, que devem ter nível de expressão estável independente das condições experimentais utilizadas. Porém, não existe um gene de referência universal que pode ser utilizado para qualquer organismo e condições experimentais, sendo necessária sua validação nas condições específicas do experimento.

Buscando uma nova alternativa de controle de *H. armigera*, o objetivo geral do trabalho foi verificar se ocorre o silenciamento do gene *rieske* quando as larvas são alimentadas com discos foliares de soja contendo RNAdf *rieske*. Além da ocorrência e nível de silenciamento, os objetivos específicos foram verificar a ocorrência de mortalidade e alterações no desenvolvimento de *H. armigera* resultantes da alimentação com RNAdf *rieske* e consequente silenciamento gênico. Para uma correta e precisa avaliação dos níveis de expressão gênica foi realizada a validação de genes de referência candidatos nas condições bióticas específicas do estudo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Helicoverpa armigera*

#### 2.1.1 Biologia

*Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) pertence ao complexo de lagartas da subfamília Heliothinae. A espécie estabeleceu-se em regiões de clima tropical e temperado (LAMMERS & MACLEOD, 2007). Encontra-se distribuída por toda a Europa, em países da Ásia, África, Oceania e América (EPPO, 1981; LAMMERS & MACLEOD, 2007; CZEPAK et al, 2013; SENAIVE, 2013; MÚRUA et al., 2014; NORTH AMERICAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION, 2015). Até 2013, era considerada praga quarentenária no Brasil, quando ocorreu sua identificação em diversas regiões agrícolas do país (CZEPAK et al., 2013). No Rio Grande do Sul, a confirmação oficial da presença de *H. armigera* ocorreu em 2013 (SALVADORI et al., 2013; SALVADORI et al., 2014).

A importância econômica dessa praga varia de país para país, de acordo com as culturas que são atacadas (PINÓIA, 2012). O Brasil, por ser um país de clima tropical e com possibilidade de realizar a colheita de duas a três safras consecutivas por ano, fornece condições ideais para o desenvolvimento de espécies polípagas, como *H. armigera*. Além disso, essa praga é de difícil controle, o que aumenta os danos causados (SANTOS et al, 2014).

A característica desta espécie em atacar preferencialmente as partes reprodutivas da planta é o fator determinante para os prejuízos causados por esta praga.

*H. armigera* é uma espécie holometabólica, ou seja, apresenta metamorfose completa, com as fases de ovo, larva, pupa e adulto. O ciclo completo de desenvolvimento dura de tinta à sessenta dias (GUEDES et al., 2013). As mariposas fêmeas ovipositam, em média, entre mil e mil e quinhentos ovos (EPPO, 1981). A oviposição geralmente ocorre durante a noite, uma vez que esta espécie é de hábito predominantemente crepuscular (ARAÚJO, 1990). Os ovos são colocados de forma isolada ou em pequenos grupos, preferencialmente na face adaxial da folha, sobre talos, flores, frutos e brotações apicais com superfícies pubescentes (MENSAH, 1996).

Aspectos relacionados ao ciclo biológico de *H. armigera* são amplamente afetados por fatores bióticos e abióticos (EPPO, 1981). Os principais fatores de variação no ciclo biológico do inseto são temperatura, umidade, fotoperíodo e hospedeiro disponível (GUEDES et al., 2013).

Segundo Araújo (1990), as condições ideais para o desenvolvimento de *H. armigera* são de 25 °C, com intervalos extremos de 15 °C à 35 °C, umidade relativa de 90% e fotoperíodo de 16 horas.

O período larval é constituído por cinco a seis instares. O número de instares e a duração varia conforme as condições do ambiente. Em condições de laboratório (temperatura:  $26 \pm 1$  °C, umidade relativa: 60-70% e fotoperíodo: 16 horas), Nasreen & Mustafa (2000) observaram

que a necessidade de tempo para o desenvolvimento, em cada ínstar, aumenta do primeiro ao sexto ínstar, totalizando 15 a 17 dias de duração do período larval. Em condições extremas, o período larval pode levar 41,1 dias a 15 °C e 10,9 dias a 35 °C (FERREIRA, 1989). O período pupal para o macho é de  $15,4 \pm 0,5$  dias e para a fêmea  $13,2 \pm 0,5$  dias, na temperatura de  $26 \pm 1$  °C (NASREEN & MUSTAFA, 2000).

A longevidade média das fêmeas é de 11,7 dias e dos machos é de 9,2 dias (ALI & CHOUDHUROY, 2009). O período de oviposição é de, aproximadamente, cinco dias (NASERI et al, 2011).

Da mesma forma, a dinâmica populacional de *H. armigera* é determinada de acordo com as condições ambientais e dos hospedeiros disponíveis (EPPO, 1981). Especialmente, condições de temperatura desfavoráveis acabam por interferir no desenvolvimento deste inseto. Em condições naturais, os insetos podem passar por estresses de altas temperaturas em determinadas horas do dia. Mironidis & Savopoulou-Soltani (2010) verificaram redução na taxa de sobrevivência, na longevidade do adulto e na fecundidade, chegando à ausência de oviposição, quando os adultos foram submetidos a choques de temperatura de 40 a 46,5 °C em intervalos de tempo que variaram de 1,5 a 540 minutos, destacando a temperatura como principal fator no desenvolvimento de *H. armigera*.

No sul do Brasil, como no Rio Grande do Sul, o clima nos últimos anos tem sido favorável para o desenvolvimento de *H. armigera* e outras pragas. Outonos mais longos e invernos menos rigorosos influenciam a dinâmica



populacional das pragas. Para *H. armigera*, a temperatura é o principal fator que afeta seu desenvolvimento, temperaturas altas aceleram o ciclo e aumentam a sobrevivência. Além disso, a presença de hospedeiros alternativos na entressafra auxilia na sobrevivência da praga (SALVADORI & SUZANA, 2014; SUZANA et al., 2015; SALVADORI & SUZANA, 2015).

Diapausa e capacidade de deslocamento, desde vôos de curta distância à migração de longa distância, são estratégias utilizadas por muitos insetos para superar, no espaço ou no tempo, condições desfavoráveis (SOUTHWOOD, 1977). *H. armigera* apresenta as duas estratégias (ZHOU et al., 2000) e essa característica é comprovada pela expansão no Brasil e rápida distribuição no Rio Grande do Sul (GUEDES et al., 2013).

Temperaturas entre 33 e 39 °C resultam em diapausa de verão (LIU et al., 2006), da mesma forma, temperaturas baixas acarretam a diapausa de inverno. A diapausa é uma das formas de adaptação a condições desfavoráveis, uma vez que permite que as pupas sobrevivam a condições desfavoráveis e possam retornar seu desenvolvimento com condições favoráveis (LIU et al., 2006). Além disso, a diapausa pode conferir benefícios para a prole (BUTLER et al., 1985). Liu et al. (2006) verificaram que a prole dos insetos que haviam passado por diapausa apresentam maior taxa de sobrevivência em relação à prole dos insetos que não passaram por diapausa.

Fatores bióticos, como a presença de hospedeiros alternativos, são de extrema importância na dinâmica temporal e espacial de *H. armigera*, uma vez que podem dar suporte à

permanência de populações de pragas se as condições ambientais forem favoráveis (FITT, 1989). O hábito alimentar polífago, em associação com uma alta capacidade reprodutiva, de dispersão e adaptação a diferentes cultivos e ambientes tende a favorecer o sucesso da espécie *H. armigera* como praga, dificultando seu controle (CZEPAK et al., 2013; FITT et al., 1995).

*H. armigera* já foi encontrada se alimentando de mais de 170 espécies de plantas, de 68 famílias (FITT, 1989; CUNNINGHAM & ZALUCKI, 2014), incluindo culturas de importância econômica, como o algodão, leguminosas em geral, sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), milho (*Zea mays* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), plantas ornamentais e frutíferas (FITT, 1989, MORAL GARCIA, 2006). As larvas apresentam preferência alimentar por folhas jovens e frutos, interferindo diretamente na qualidade e na produtividade dos cultivos atacados (MAMTA et al., 2016).

No Brasil, as práticas agrícolas fornecem ampla gama de plantas hospedeiras para desenvolvimento de *H. armigera*. Estudo realizado por Reigada et al. (2015) demonstrou que a soja, o algodão e o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) são melhores hospedeiros para *H. armigera* completar seu ciclo de vida em relação à milho, sorgo, milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Brown) e crotalária (*Crotalaria spectabilis* Roth). Porém, as estruturas reprodutivas de milho, fornecem um bom alimento para o desenvolvimento larval de *H. armigera* (SUZANA et al., 2015). No Brasil, é praga de soja e algodão, principalmente, mas também foi

encontrada em espigas de milho e, no período de entressafra, em espigas de trigo (*Triticum aestivum* L.), síliquas de canola (*Brassica napus* L.), cápsulas de linho (*Linum usitatissimum* L.) e em espécies de plantas espontâneas, como nabo (*Raphanus sativum* L.) e aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb) (GUEDES et al. 2013, ARNEMANN et al. 2014, SALVADORI & SUZANA 2014). A ocorrência em diferentes plantas hospedeiras, mesmo em baixa densidade, pode ser uma estratégia de sobrevivência até encontrar um alimento capaz de sustentar o completo desenvolvimento do inseto (MOSCARDI et al. 2012).

A presença de ovos e larvas em espécies hospedeiras que não são favoráveis ao desenvolvimento larval de *H. armigera* pode indicar a preferência dos adultos por estas plantas e não uma correlação entre a escolha do hospedeiro e o desenvolvimento larval (REIGADA et al., 2015). Os adultos são atraídos por plantas que produzem néctar, o que influencia a escolha do hospedeiro (ÁVILA et al., 2013). Além disso, compostos secundários produzidos pelas plantas hospedeiras influenciam o comportamento de colonização de *H. armigera* (FIREMPONG & ZALUCKI, 1991).

Estudos apontam a prevalência de *H. armigera* em dicotiledôneas, enquanto *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) é prevalente em milho (LEITE et al., 2014). Porém, larvas de *H. armigera* foram encontradas em espigas de milho, e estudos comprovaram que esse alimento fornece condições nutricionais para a sobrevivência, crescimento e desenvolvimento das larvas (SUZANA et al., 2015). Além disso, estudos demonstram que na Austrália, milho e sorgo são

hospedeiros potenciais e que contribuem para o aumento das populações de *H. armigera* (WARDHAUGH et al., 1980; MAELZER & ZALUCKI, 1999). Possivelmente, em alguns anos, *H. armigera* poderá ser encontrada mais comumente nesses cultivos devido à adaptação da espécie às condições de cultivo brasileiras (REIGADA et al., 2015).

### 2.1.1 Controle

Os métodos de controle de *H. armigera* são baseados na utilização de cultivares resistentes, uso de inseticidas químicos e biológicos e o controle biológico (ÁVILA, 2013, SALVADORI & SUZANA, 2014). A utilização de plantas geneticamente modificadas contendo o gene *cry* oriundo da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillales: Bacillaceae) é uma boa estratégia de controle desta praga devido à facilidade operacional e à redução do impacto e dos riscos em relação ao meio ambiente podendo ser utilizada em associação com outros métodos de controle (SALVADORI & SUZANA, 2015).

Uma das questões fundamentais para o controle efetivo de *H. armigera*, tanto pela utilização de plantas geneticamente modificadas quanto pelo uso de inseticidas, é o monitoramento de ovos, lagartas, pupas e adultos. O conhecimento dessas informações irá definir as táticas de controle (ÁVILA et al., 2013).

Os primeiros estádios de desenvolvimento são o momento mais adequado para controle químico de *H. armigera*,

pois as larvas estão mais expostas e suscetíveis ao contato de produtos químicos aplicados em pulverização (ÁVILA et al., 2013). Além disso, o tegumento com aspecto levemente coriáceo das larvas (CZEPAK et al., 2013) pode estar relacionado à resistência que os insetos apresentam aos inseticidas, especialmente, os produtos com ação de contato como piretróides, organofosforados e carbamatos (ÁVILA et al., 2013).

*B. thuringiensis* (Bt) é uma bactéria gram-positiva e entomopatogênica que ocorre naturalmente em diversos habitats incluindo solo, filoplano, resíduos de grãos, poeira, água, matéria vegetal e insetos (EMBRAPA, 2009). Durante a fase de esporulação, as bactérias sintetizam proteínas que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais em um dos polos da célula (LERECLUS, 1988; HÖFTE & WHITELEY, 1989; PEFERÖEN, 1997). Os cristais também são chamados de  $\delta$ -endotoxinas e possuem propriedades inseticidas específicas (BOUCIAS & PENDLAND, 1998).

As  $\delta$ -endotoxinas constituintes dos cristais são solubilizadas no intestino médio dos insetos e as protoxinas convertidas em polipeptídeos menores no trato digestivo das larvas suscetíveis. Esses polipeptídeos associam-se a receptores específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células do intestino dos insetos, causando lise osmótica por meio da formação de poros na membrana (FIUZA et al., 1996; SCHNEPF et al., 1998)

*B. thuringiensis* tem sido utilizado há mais de meio século mediante aplicação dos esporos e cristais nas plantas. No

final da década de 80 e início da década de 90, por meio da engenharia genética, genes de Bt codificadores de proteínas CRY foram isolados e introduzidos em plantas agronomicamente importantes, como tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), tomate, algodão, batata (*Solanum tuberosum* L.) e milho. Essas plantas expressam as entomotoxinas, tornando-as resistentes ao ataque dos insetos suscetíveis às toxinas Bt (SCHNEPF et al., 1998).

O uso de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos é adotado em vários países, devido à proteção que proporcionam e à redução na aplicação de inseticidas (AVILA et al., 2005). Porém, há relatos de populações de *H. armigera* resistentes, tanto a algumas classes de inseticidas quanto a eventos de plantas geneticamente modificadas contendo o gene *cry* (FORRESTER et al., 1993; McCAFFERY, 1998; ALVI et al., 2012; DOWNES & MAHON 2012; WEI et al., 2014).

A utilização de plantas geneticamente modificadas revolucionou o controle de insetos-praga em diversas culturas. Porém, sem a aplicação de estratégias adequadas de manejo, visando evitar ou retardar o desenvolvimento de insetos resistentes, a expectativa de vida desta tecnologia pode ser curta (AVILA et al., 2005; ALVI et al., 2012).

O manejo de resistência ao Bt inclui o plantio de cultivares que expressam nível de toxina suficiente para controle dos insetos suscetíveis homozigotos e heterozigotos e plantio da área de refúgio para produção de insetos suscetíveis. O cruzamento entre insetos suscetíveis e resistentes produzem

progênie heterozigota que é suscetível às proteínas CRY, uma vez que a maioria dos casos de resistência são recessivos. A rotação de genes de resistência a insetos e o empilhamento gênico são consideradas estratégias promissoras para retardar o aparecimento de insetos resistentes (AVILA et al., 2005; GUJAR et al., 2007).

Considerando os casos de resistência de *H. armigera* aos principais mecanismos de controle utilizados atualmente, é visível a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias para uso isolado ou em associação com outros métodos de controle. Uma das alternativas estudadas é o uso do mecanismo de RNA de interferência para silenciamento de genes vitais do inseto alvo.

## **2.2 RNA de interferência**

O RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, ou seja, ocorre no nível de RNA mensageiro (RNAm). O mecanismo de RNAi é altamente conservado em eucariotos, tem importante função na regulação da expressão gênica, está relacionado à defesa do organismo à elementos de transposição de DNA e, em plantas e insetos, tem importante papel contra infecções virais (DING, 2010; MATRANGA & ZAMORE, 2007; VAN RIJ & BEZERIKOV, 2009).

O mecanismo de regulação negativa de expressão de genes foi demonstrado inicialmente em plantas de petúnia (*Petunia hybrida* L.) por Napoli et al. (1990). Os autores, na

tentativa de super expressar o gene *chs* (*chalcone sintase*), a fim de aumentar a síntese de antocianinas, verificaram que as plantas geneticamente modificadas obtidas possuíam flores brancas ou com manchas brancas causado pela ausência ou redução do pigmento devido ao silenciamento do transgene e do gene endógeno, fenômeno conhecido como co-supressão.

Posteriormente, Guo & Kempheus (1995) verificaram o silenciamento mediado pela introdução da fita de RNAm antissenso do gene *par-1* no nematoide *Caenorhabditis elegans* Maupas (Rhabditida: Rhabditidae). Fire et al. (1998) injetaram simultaneamente, moléculas de RNA senso e antissenso em *C. elegans* e verificaram que o silenciamento era muito mais eficiente e potente. Os experimentos demonstraram que a molécula iniciadora do mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (*Post-transcriptional gene silencing* – PTGS) é o RNA dupla-fita (RNAdf), ou seja, a sequência senso e antissenso do RNAm alvo. Devido à habilidade do RNAdf interferir na expressão gênica, o mecanismo passou a ser chamado de RNA de interferência (RNAi).

A comprovação de que o mecanismo de silenciamento gênico mediado por RNAi ocorre em nível pós transcricional foi demonstrado por Montgomery (1998) em *C. elegans*, pois não foi observada alteração na sequência de DNA do gene-alvo e o nível de transcritos no citoplasma foi reduzido.

Estudos posteriores indicaram que o mecanismo de RNAi é dividido em três etapas principais: i) clivagem do RNAdf pela enzima DICER; ii) ligação ao Complexo de Silenciamento induzido por RNA (*RNA-induced Silencing*



*Complex-RISC*) e; iii) silenciamento do gene-alvo pela degradação do RNAm alvo ou inibição da tradução (ZAMORE et al., 2000; RAHMAN et al., 2008; WINTER et al., 2009).

A enzima DICER é uma endonuclease específica de RNAdf (ou ribonuclease III- Dicer-2), que, na presença de ATP, cliva o RNAdf em fragmentos menores de 21-23 nucleotídeos. Esses fragmentos podem ser divididos em dois grupos (MATRANGA & ZAMORE, 2007; GHILDIYAL & ZAMORE, 2009; ASGARI, 2013): i) os micro RNAs (miRNAs), que são oriundos do processamento de transcritos endógenos das células e são responsáveis pela regulação gênica e, ii) os *Small interfering RNAs* (siRNAs) derivados da clivagem de moléculas de RNAdf expresso em forma de *hairpin* ou introduzido artificialmente na célula. O uso experimental do mecanismo de RNAi explora a rota do siRNA, focando, especialmente, na capacidade das células em degradar RNAsm pela complementariedade às moléculas de RNAdf administradas (SCOTT et al., 2013).

Os siRNA são carregados no complexo RISC, o qual contém a proteína Argonata, com seu componente catalítico, responsável pela degradação do RNAm alvo. Uma das fitas do siRNA é degradada mantendo a fita guia, formando a estrutura denominada *single strand RNA* (ssRNA), que tem a função de localização e ligação com o RNAm alvo. O complexo RISC, guiado pela molécula de ssRNA, encontra o RNAm alvo e media a clivagem ou inibição da tradução. O grau de complementariedade determina o mecanismo de silenciamento do gene-alvo. Completa complementariedade, geralmente,

determina a degradação do RNAm, enquanto a complementariedade parcial resulta da inibição da tradução (ROETHER & MEISTER, 2011; BURAND & HUNTER 2013).

O RNAi provou ser promissor em várias áreas da ciência: na genômica para estudos de função gênica; na medicina para controle de doenças como o câncer e infecções virais (RAHMAN et al., 2008) e, na agricultura pelo desenvolvimento de uma nova tecnologia de controle de insetos-praga (PRICE & GATEHOUSE, 2008; HUVENNE & SMAGGHE, 2010).

O uso de RNAdf para silenciamento gênico por RNAi é utilizado para estudos de genômica funcional em diversos insetos, de diferentes ordens (BELLES, 2010). Geralmente, para estudos de expressão gênica se utiliza a técnica de microinjeção de RNAdf ou siRNA diretamente no corpo do inseto (BURAND & HUNTER 2013). Essa técnica exclui as dificuldades de captação do RNAdf pela célula e, dessa forma, o funcionamento do mecanismo de silenciamento por RNAi depende exclusivamente da existência da maquinaria *core* do RNAi (TERENIUS et al., 2011), composta pelas enzimas *dicer* e *argonata* (GARBUIT & REYNOLDS, 2012). A maioria dos eucariotos, incluindo plantas e animais, possuem a maquinaria *core* do RNAi necessária para resposta de silenciamento (SCOTT et al., 2013).

Apesar da técnica de microinjeção apresentar melhores resultados de silenciamento, essa técnica não é aplicável a campo, para controle de insetos-praga (BURAND & HUNTER, 2013). Muitos pesquisadores têm se dedicado ao

estudo da resposta do RNAi à disponibilização via oral do RNAdf sintetizado *in vitro* ou expresso em plantas geneticamente modificadas e tem mostrado resultados encorajadores (revisado por TERENCE et al., 2011; revisado por LIM et al., 2016). Recentemente, foi registrado a primeira liberação comercial nos Estados Unidos e Canadá de plantas transgênicas de milho resistentes à *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) (evento MON87411). As plantas geneticamente modificadas possuem os genes para a delta toxina *cry 3Bb1* e para a produção do RNAdf do gene *Snf7* de *D. virgifera virgifera* (ISAAA, 2015).

Para os experimentos com RNAdf exógeno, três principais processos estão envolvidos no sucesso do mecanismo de RNAi: i) captação da molécula indutora de RNAi, geralmente RNAdf, pelas células; ii) produção de moléculas de RNAdf secundárias e; iii) transferência dessas moléculas para outras células (SCOTT et al., 2013) (Figura 1).

Whangbo & Hunter (2008) propuseram três tipos de resposta do RNAi: i) RNAi celular autônomo (*cell-autonomous* RNAi) em que o silenciamento é restrito às células em que o RNAdf é expresso ou introduzido; ii) RNAi ambiental, que envolve a captação do RNAdf do lúmen pelas células intestinais, ou seja, absorção do RNAdf do ambiente para dentro da célula e; iii) RNAi sistêmico, em que o silenciamento por RNAi se amplifica das células em que o RNAdf foi originalmente produzido ou captado (Figura 2).



Figura 1 – Processos de RNAi em insetos. Captação e processamento RNAdf na célula, amplificação dentro e entre células e efeitos moleculares e fenotípicos observados. Adaptado de Scott et al. (2013).

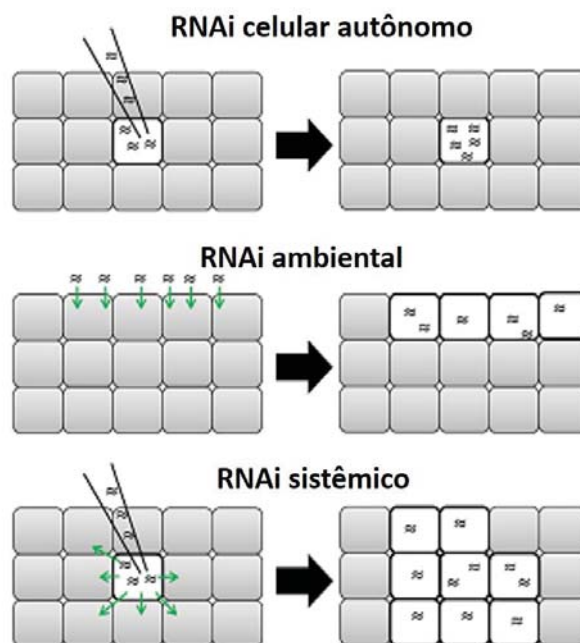


Figura 2 – Tipos de RNAi. Adaptado de Lim et al., 2016.

Para utilização como método de controle de insetos-praga, o foco do estudo é relacionado ao RNAi ambiental, que envolve a captura do RNAdf/siRNA pelo lúmen do intestino do inseto, e, o RNAi sistêmico, que aumenta a gama de genes alvo do silenciamento, por possibilitar o silenciamento de genes expresso em outros tecidos e envolvidos em funções não relacionadas ao sistema digestório (KUMAR et al., 2009; ASOKAN et al., 2014; MAMTA et al., 2016).

Os dois diferentes mecanismos de captação do RNAdf/siRNA pelas células são: captação mediada por canais transmembrana, verificado em *C. elegans*, e, captação mediada por endocitose, observada em células S2 de *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) (YU et al., 2013).

Em *C. elegans*, duas proteínas, SID-1 e SID-2, estão envolvidas na captação do RNAdf e resposta sistêmica. SID-1 é uma proteína transmembrana, essencial para resposta sistêmica, atuando no transporte de RNAdf entre as células (WINSTON et al., 2002; JOSE et al., 2009). SID-2 é encontrada principalmente no sistema digestório e, se acredita que atue em colaboração com a SID-1 no transporte do RNAdf entre as células (WINSTON et al., 2007; WHANGBO & HUNTER, 2008). Ortólogos do gene *sid* foram encontrados em diversos insetos de diferentes ordens (revisado por HUVENNE & SMAGGHE, 2010).

O inseto-modelo, *D. melanogaster*, não apresentou resposta robusta de RNAi e não foram encontrados ortólogos do gene *sid* neste inseto (HUVENNE & SMAGGHE, 2010). Porém,

células S2 de *D. melanogaster* mostraram resposta de RNAi quando foram expostas à meio contendo RNAdf, sugerindo a existência de um mecanismo alternativo de captura de RNAdf. O mecanismo alternativo proposto envolve endocitose do RNAdf, porém, o processo de reconhecimento e transporte do RNAdf para o local apropriado na célula ainda não é bem esclarecido (SALEH et al., 2006; ULVILLA et al., 2006) (Figura 3).

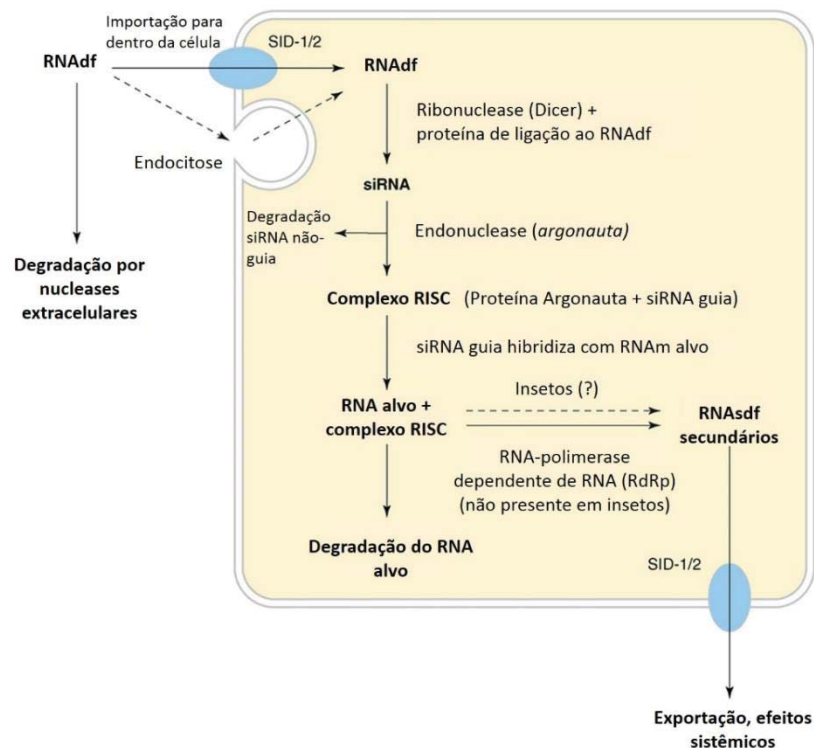


Figura 3 – Via de silenciamento gênico local e sistêmico mediado por RNAdf. Adaptado de Price & Gatehouse (2008).

A presença da enzima RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase – RdRp*) facilita a

amplificação do silenciamento do gene alvo mediado por RNAi. Os fragmentos de ssRNA servem como molde (*template*) para a síntese de novas moléculas de RNAdf pela enzima RdRp. A eficiente amplificação do silenciamento por RNAi pela RdRp pode reduzir os níveis do RNAm alvo a níveis indetectáveis, além de ter potencial para ocasionar efeitos de RNAi sistêmicos e persistentes (SIJEN et al., 2001). A RdRp foi identificada em microorganismos eucariotos, fungos, plantas, nematoides e no cefalocordado *Branchiostoma floridae* Hubbs (Amphioxiformes: Branchiostomidae), porém, não foi identificada em insetos, moluscos ou outros vertebrados (PRICE & GATEHOUSE, 2008). Em células de *D. melanogaster* foi identificada atividade semelhante à RdRp por enzimas alternativas (LIPARDI et al., 2001).

Diversos autores comprovaram a existência de RNAi sistêmico e amplificação do sinal de RNAi para o restante do organismo em insetos, mesmo na ausência de RdRP. Quando alimentados com RNAdf/siRNA de genes-alvo expressos em tecidos variados, sem envolvimento com funções no sistema digestório, os insetos apresentaram redução na expressão do gene alvo, mortalidade e efeitos no fenótipo (KUMAR et al., 2009; ASOKAN et al., 2013; ASOKAN et al., 2014; MAMTA et al., 2016; YANG & HAN, 2014; CHOI et al., 2012). Porém, ainda não é claro como o sinal de RNAi se amplifica para todo o organismo (TOMOYASU et al. 2008).

Nem todas as espécies de insetos são igualmente suscetíveis ao RNAi, alguns insetos parecem ser relativamente ou completamente insensíveis ao RNAi (BELLÉS, 2010,

TERENIUS et al., 2011). De acordo com Huvenne & Smagghe (2010), os principais fatores que interferem no silenciamento e consequentemente na eficiência do mecanismo de RNAi como alternativa de controle de insetos-praga são: i) concentração de RNAdf; ii) sequência de nucleotídeos; iii) tamanho do fragmento de RNAdf; iv) persistência do silenciamento, e; v) estágio de desenvolvimento do organismo alvo alimentados oralmente com o RNA. Além disso, variações na eficiência do mecanismo de RNAi são dependentes da escolha do gene alvo e do local da sua expressão, da metodologia de disponibilização do RNAdf aos insetos e de características intrínsecas da capacidade de captação e processamento do RNAdf (TERENIUS et al., 2011; BURAND & HUNTER, 2013; YU et al., 2013; LIM et al., 2016).

O tamanho do fragmento de RNAdf/siRNA também pode interferir na eficiência do silenciamento gênico. Geralmente, a administração de moléculas de RNAdf de 50 à 200pb tem mostrado bons resultados (HUVENNE & SMAGGHE, 2010), porém, a administração de siRNA também foi efetiva, inclusive para *H. armigera* (KUMAR et al., 2009; MAO et al., 2015). Estudos em *H. armigera*, utilizando administração oral de RNAdf, mostraram redução da expressão gênica quando foram utilizadas sequências de RNAdf de 100 à 1068 pb, sugerindo alta tolerância ao tamanho do RNAdf em termos de eficiência do silenciamento (revisado por LIM et al., 2016).

As vantagens da utilização de RNAsdf maiores que 200 pb para a utilização do RNAi como estratégia para o



controle de insetos é a produção de diversos siRNAs após a clivagem pela enzima Dicer, maximizando a abrangência do RNAm alvo, e conseqüentemente, aumentando a probabilidade de silenciamento e a eficácia do mecanismo de RNAi (SCOTT et al., 2013; LIM et al., 2016)

Diferenças entre resultados de experimentos semelhantes, porém, de diferentes laboratórios são relatadas (TERENIUS et al., 2011). Não há um protocolo único que possa ser utilizada para qualquer experimento com RNAdf, e a aplicação da tecnologia de RNAi visando o controle de insetos-praga é um exercício de testes e análise de metodologias que apresentem resultados promissores (SCOTT et al., 2013).

Insetos da ordem Lepidoptera, especialmente, apresentam alguns aspectos recalcitrantes ao mecanismo de RNAi, principalmente quando a molécula de RNAdf/siRNA é disponibilizada via oral. A presença de RNAses (ZHANG et al., 2015) e o pH alcalino do intestino de lepidópteros (TERRA et al., 1996) pode contribuir para a degradação do RNAdf disponibilizado. Dessa forma, geralmente, são necessárias altas doses de RNAdf para que sejam observados redução da expressão do gene alvo, mortalidade e efeitos fenotípicos (TERENIUS et al., 2011).

A eficiência dos experimentos de RNAi são amplamente influenciados pelo método de disponibilização da molécula de RNAdf/siRNA. Considerando a aplicação prática da tecnologia de RNAi para controle de insetos-praga a disponibilização oral é o melhor método (TERENIUS et al., 2011; SCOTT et al., 2013). As estratégias de disponibilização

oral de RNAdf/siRNA incluem a incorporação de RNAdf/siRNA sintetizado *in vitro* na dieta artificial ou na superfície de discos foliares, a utilização de bactérias geneticamente transformadas expressando o RNAdf do gene alvo que são incorporadas na dieta ou então que são utilizadas para a produção de RNAdf que depois é isolado e utilizado nos experimentos (KUMAR et al., 2009; YANG & HAN, 2014; ASOKAN et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

Adicionalmente, um método que pode apresentar melhores resultados em relação à alimentação direta com RNAdf/siRNA é a utilização de plantas geneticamente modificadas com uma construção contendo a fita senso e antissenso do gene alvo do silenciamento separada por sequência espaçadora (YANG et al., 2011; LIM et al., 2016). A vantagem desse método é a produção contínua de RNAdf/siRNA, oferecendo maior eficiência de silenciamento com menor custo em insetos que requerem altas doses e administração contínua de RNAdf/siRNA, como os da ordem Lepidoptera (TERENIUS et al., 2011; YANG et al., 2011). A efetividade do silenciamento gênico mediante a alimentação com plantas transgênicas expressando o RNAdf foi demonstrada para insetos da ordem Lepidoptera (MAO et al., 2007; MAO et al., 2011; LIU et al., 2015; MAMTA et al., 2016), Coleoptera (BAUM et al., 2007) e Hemiptera (PITINO et al., 2011; ZHA et al., 2011).

Apesar dos aspectos recalcitrantes em lepidópteros, experimentos utilizando RNAdf/siRNA têm sido realizados em diversos insetos dessa ordem a fim de fornecer maiores

informações relativas ao funcionamento do mecanismo de RNAi e, também, objetivando o desenvolvimento de tecnologias baseadas no silenciamento gênico para controle de insetos-praga desta ordem, incluindo *H. armigera* (revisado por TERENIUS et al., 2011; LIM et al., 2016).

Para *H. armigera*, inseto que se destaca pela polifagia, capacidade de adaptação, dificuldade de controle e grande potencial de dano, o primeiro trabalho utilizando o mecanismo de RNAi como alternativa de controle foi realizado por Mao et al. (2007). As larvas alimentadas com plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) e tabaco geneticamente transformadas para expressar o RNAdf do gene *citocromo P450*, envolvido na detoxificação do gossipol, apresentaram inibição do crescimento (MAO et al., 2007). Posteriormente, a mesma construção foi utilizada para transformação genética de algodão. As larvas alimentadas com as plantas geneticamente transformadas apresentaram redução de crescimento e consumo (MAO et al., 2011).

Posteriormente, diversos trabalhos foram realizados tendo como alvo *H. armigera*. Os principais genes-alvo de silenciamento testados para este inseto estão relacionados ao sistema digestório, como *citocromo P450 tripsina* e *quimotripsina* (MAO et al., 2007; MAO et al., 2011; ZHANG et al., 2013; ASOKAN et al., 2014; MAO et al., 2015), ao sistema nervoso, como a acetilcolinesterase (KUMAR et al., 2009), ou então estão expressos em todo o organismo, como os genes, *transferrina*, *quitinase*, *arginina quinase* e *ATPase vacuolar*; (ASOKAN et al., 2014; YANG & HAN, 2014; LIU et al., 2015;

MAO et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Os principais resultados obtidos através da administração oral de RNAdf/siRNA estão relacionados à mortalidade, redução do consumo, inibição do crescimento, má-formação e redução da fecundidade, estes efeitos observados estão associados à redução na expressão do gene alvo do silenciamento (revisado por LIM et al., 2016), indicando o potencial de utilização da tecnologia de RNAi para o controle deste inseto-praga.

Para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos para o controle de insetos-praga é essencial que a escolha do gene alvo leve em consideração, além da capacidade de causar a mortalidade e afetar o desenvolvimento, a especificidade, ou seja, e identidade entre o RNAdf e o RNAm do inseto-alvo. De forma que a alimentação com o RNAdf específico para um inseto não atinja outras espécies não alvo (BACHMAN et al., 2013; GU & KNIPPLE, 2013; SCOTT et al., 2013).

O gene *rieske* codifica a proteína Iron-sulfur, que compõe o Citocromo bc1 da membrana mitocondrial, também conhecido como Ubiquinol-citocromo-c Redutase ou Complexo III (Figura 4). Essa proteína foi descrita por Rieske et al. (1964). O Complexo III é o principal responsável pela cadeia de transferência de elétrons da mitocôndria, catalisando a transferência de elétrons do ubiquinol para a citocromo-c, concomitantemente ocorre a translocação de prótons através da membrana gerando o gradiente eletroquímico necessário para síntese do ATP (GONG et al., 2011).

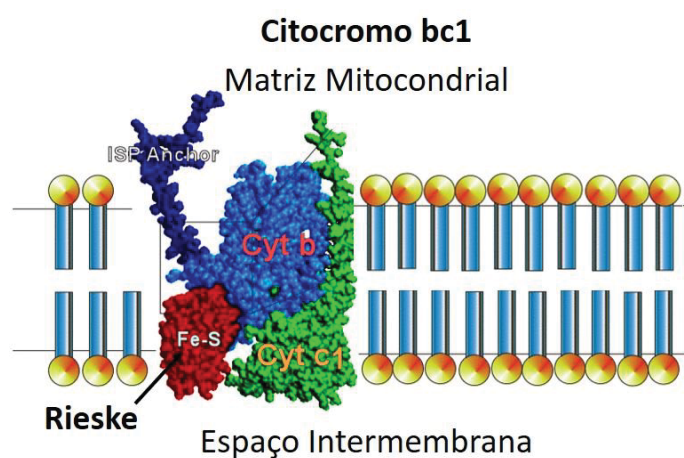


Figura 4 – Esquema do Citocromo bc1 da membrana mitocondrial indicando a localização da proteína Iron-sulfur (Fe-S) a qual é codificada pelo gene *rieske*. Adaptado de [www.biotech-resourch.com](http://www.biotech-resourch.com)

O potencial de utilização deste gene como alvo de silenciamento já foi demonstrado para *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (GONG et al., 2011) e para *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) (RAMOS et al., 2014), psilídeo vetor das bactérias que causam o *Grenning*, umas das principais doenças que afetam a citricultura. Porém, para *H. armigera* não há estudos da efetividade do silenciamento do gene *rieske* mediado pelo mecanismo de RNAi e induzido por RNAdf e de seus efeitos letais deletérios no desenvolvimento destes insetos.

### 2.3 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real

A análise dos resultados de experimentos envolvendo RNAi requer a utilização de técnicas moleculares

para quantificação da expressão gênica e verificação da efetividade do silenciamento do gene alvo. Atualmente a técnica mais utilizada é *Reverse Transcription Quantitative Real Time-PCR* (RT-qPCR), ou seja, a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizando como molde o RNA.

O RT-qPCR é, basicamente, a combinação de três etapas: i) transcrição reversa do RNA em cDNA pela enzima *Transcriptase Reversa*; ii) amplificação do cDNA usando PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e, iii) detecção e quantificação dos produtos da PCR em tempo real (GIBSON et al., 1996). A quantificação dos produtos de PCR se dá pela absorção da fluorescência pelo termociclador. Fluorocromos intercalados na cadeia de cDNA ou presentes em sondas de hibridização específica são adicionados na reação do RT-qPCR. Na presença de produto amplificado, os fluorocromos emitem fluorescência proporcional à quantidade de produto amplificado. O sinal fluorescente é captado pelo sistema óptico do termociclador e analisados por software que expressa graficamente o sinal fluorescente em relação aos ciclos de amplificação, permitindo monitorar, em tempo real, a cinética e eficiência da amplificação (HEID et al., 1996; BUSTIN et al., 2000).

A técnica de RT-qPCR é altamente sensível, reproduzível e específica (BUSTIN et al., 2000; DERVEAUX et al., 2004) e é amplamente utilizada para análise de expressão gênica em diversas áreas de pesquisa (PFAFFL, 2004).

A precisão da amplificação do cDNA alvo pelo RT-qPCR é uma das principais vantagens da técnica e ao mesmo

tempo uma das principais dificuldades (RADONIC et al., 2004). Erros na pipetagem, variações na extração e purificação do RNA, síntese e quantificação do cDNA, procedimentos do RT-qPCR, eficiência dos *primers* entre outros aspectos podem gerar variações não específicas, que não são resultantes dos tratamentos à que as amostras foram submetidas (ANDERSEN et al., 2004; RADONIC et al., 2004; FLEIG & PFAFFL, 2006; BUSTIN et al., 2009).

A obtenção de resultados confiáveis é dependente de estratégias experimentais específicas que visem minimizar as variações na qualidade, quantidade e estabilidade do RNA, além de priorizar a eficiência na transcrição reversa, etapas do RT-qPCR e análise dos dados obtidos (FLEIG & PFAFFL, 2006, DERVEAUX et al., 2010).

Porém, mesmo com uma metodologia eficiente e tomando todos os cuidados necessários em todas as etapas para realização do RT-qPCR, podem ocorrer variações entre as amostras que não são de natureza de variações biológicas, mas sim de variações técnicas (DERVEAUX et al., 2010).

A utilização de genes de referência pode evitar a interferência dos erros e variações não específicas na análise dos resultados do RT-qPCR (HUGGET et al., 2005, RADONIC et al., 2004). Genes de referência são utilizados como controle para normalização dos dados do RT-qPCR para análise da expressão gênica. Um bom gene de referência deve seguir três critérios: i) deve ter eficiência de amplificação similar ao gene alvo; ii) deve ter o nível de expressão moderado, e; iii) a expressão deve ser

estável em todas as condições experimentais testadas (BUSTIN et al., 2000; TENG et al., 2012).

A utilização de um bom gene de referência permite a normalização das diferenças entre as amostras geradas por: i) diferentes quantidades de material inicial; ii) a qualidade do material inicial e; iii) as diferenças na extração do RNA e síntese do cDNA, uma vez que, o gene de referência é exposto às mesmas etapas de preparação que o gene de interesse (RADONIC et al., 2004).

*Actina* e *GAPDH* são comumente utilizados como genes de referência (BUSTIN et al., 2000). Muitas vezes, a escolha desses genes é baseada no histórico de utilização em diversos experimentos e não na análise de estabilidade de expressão (GLARE et al., 2002). Apesar de genes relacionados a funções celulares básicas serem, geralmente, a principal opção como genes de referência (GLARE et al., 2002; FU et al., 2013) estudos demonstram que esses genes podem apresentar variações de acordo com as condições experimentais testadas (SELVEY et al., 2001; GLARE et al., 2002; TENG et al., 2011).

Não existe um gene de referência universal, que possa ser utilizado independentemente do organismo alvo do estudo e das condições experimentais. É necessário que os genes de referência candidatos sejam testados e validados nas condições experimentais específicas (LU et al., 2013; ZHANG et al., 2015; TENG et al., 2011). Uma vez que a normalização de dados de expressão gênica com genes de referência não validados ou com baixa estabilidade de expressão pode



ocasionar erros de quantificação e análise de resultados (ZHANG et al., 2015; CHANDRA et al., 2014).

Para *H. armigera* diversos genes foram testados e validados em insetos submetidos a diferentes condições bióticas e abióticas. Os resultados demonstraram grande variação no nível de estabilidade dos genes candidatos entre diferentes condições testadas e entre os autores, demonstrando a necessidade de validação nas condições experimentais específicas de cada estudo (CHANDRA et al., 2014; SHAKEEL et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

## CAPÍTULO I

### GENES DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISE DE SILENCIAMENTO GÊNICO MEDIADO PELO RNA DE INTERFERÊNCIA EMPREGANDO RT-qPCR EM *Helicoverpa armigera*

Cássia Canzi Ceccon<sup>1</sup>

**RESUMO:** O inseto-praga *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) possui grande potencial de dano às lavouras e limitada efetividade dos principais métodos de controle atualmente utilizados. O uso do mecanismo de RNA de interferência (RNAi) para silenciamento de genes alvo vitais para o inseto surge como promissora estratégia de controle. A efetividade da técnica de RNAi é determinada pela quantificação precisa da expressão do gene a ser silenciado. A transcrição reversa seguida pelo PCR quantitativo (RT-qPCR) é uma técnica altamente sensível e precisa, amplamente utilizada para quantificação da expressão gênica. Porém, essa técnica, requer a utilização de genes de referência, que minimizam as variações experimentais entre as amostras. O objetivo do trabalho foi verificar a estabilidade dos genes de referência candidatos *actina*, *fator de alongação 1- $\alpha$  (ef1- $\alpha$ )* e *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)* em cinco

---

<sup>1</sup> Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Produção e Proteção de Plantas.

diferentes estádios de desenvolvimento larval, dois tecidos e em resposta à administração oral do RNA dupla-fita (RNAdf) do gene *rieske*. Foram utilizados cinco métodos estatísticos (GeNorm, NormFinder, BestKeeper, Coeficiente de variação e RefFinder) para avaliar a estabilidade de expressão dos genes de referência. *GAPDH* foi o gene mais estável para estádios de desenvolvimento e tecidos enquanto *ef1- $\alpha$*  foi mais estável sob tratamento com RNAdf *rieske*. Não é recomendada a utilização da *actina* como gene de referência para *H. armigera*, uma vez que mostrou ser diferencialmente regulado ao longo dos estádios de desenvolvimento, tecidos e em resposta ao tratamento oral com RNAdf *rieske*. Utilizando os critérios de avaliação adequados foi demonstrado que a disponibilização oral do RNAdf *rieske* reduziu a expressão do gene *rieske*.

**Palavras-chave:** Expressão gênica, normalização, *GAPDH*, *actina*, *ef1- $\alpha$* , RNA dupla-fita,

### ***Helicoverpa armigera* REFERENCE GENE FOR SILENCING ANALYSIS BY INTERFERENCE RNA USING RT-QPCR**

**ABSTRACT:** The insect pest *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) has great damage potential to crops and limited effectiveness of currently used control methods. The use of the RNA interference mechanism (RNAi) for silencing vital target genes within the insect is emerging as a promising alternative control strategy. The effectiveness of the RNAi technique is determined by the precise quantification of the

expression of the target gene to be silenced. Reverse transcription followed by quantitative PCR (RT-qPCR) is a highly sensitive and precise technique, widely used to quantify gene expression. However, this technique requires the use of reference genes, which minimize experimental variation among samples. The objective of the presented research was to verify the stability of the candidate reference genes *actin*, *elongation factor 1- $\alpha$*  (*ef1- $\alpha$* ) and *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) in five different stages of larval development, in two tissues and in response to orally administered *rieske* gene double-stranded RNA (dsRNA). Five statistical algorithms were used (GeNorm, NormFinder, BestKeeper, RefFinder and variation coefficient) to evaluate the expression stability of the reference genes. *GAPDH* was the most stable gene among developmental stages and tissues while *ef1- $\alpha$*  was more stable in response to treatment with dsRNA *rieske*. The use of actin as reference gene for *H. armigera* is not recommended since it was shown to be differentially regulated throughout the larval development stages, among different tissues, and in response to oral treatment with dsRNA *rieske*. Using the proper evaluation criteria it was demonstrated that oral delivery of dsRNA *rieske* reduced the expression level of the *rieske* gene.

**Key words:** Gene expression, normalization, *GAPDH*, *actin*, *ef1- $\alpha$* , double-stranded RNA

## INTRODUÇÃO

*Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) se destaca como uma das principais pragas de plantas cultivadas, especialmente devido a sua elevada plasticidade que permite que se alimente de diversos hospedeiros e sobreviva em condições adversas (CUNNINGHAM et al., 1999). As larvas se alimentam de diversas culturas de importância econômica e tem preferência pelas partes jovens e reprodutivas das plantas, dessa forma, os prejuízos causados são decorrentes da redução na produtividade e qualidade dos produtos, além do aumento dos custos para o controle (SALVADORI & SUZANA, 2014; MAMTA et al., 2016). Atualmente, o controle desta praga limita-se ao uso de inseticidas químicos e por plantas geneticamente modificadas contendo o gene *cry*, porém, esse inseto exibe capacidade de adaptação e desenvolvimento de resistência para ambas alternativas (AGGARWAL et al., 2006; DOWNES & MAHON, 2012).

A utilização do RNA de interferência (RNAi), mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, surge como uma alternativa aos métodos de controle utilizados atualmente (BAUM et al., 2007; MAO et al., 2007; PRICE & GATEHOUSE, 2008; BOLOGNESI et al., 2012; ZHANG et al., 2015; MAMTA et al., 2016).

Se o gene-alvo do silenciamento for de importância vital para o inseto, a redução da expressão poderá levar à morte ou ainda prejudicar o seu desenvolvimento, reduzindo seu

desempenho biológico. A escolha do gene-alvo do inseto é determinante no sucesso dos experimentos e na determinação do potencial de aplicação da tecnologia de RNAi como alternativa no controle de insetos-praga. O gene escolhido deve expressar uma proteína altamente relacionada às principais funções vitais do inseto (CHANDRA et al., 2014).

O gene-alvo a ser silenciado no presente estudo para controle de controle de *H. armigera* é o gene *rieske* (acesso GenBank-NCBI: JK145425.1), que codifica a proteína Iron-Sulfur, componente do Complexo III, que é o principal responsável pela cadeia de transferência de elétrons da mitocôndria, síntese de ATP e produção de energia (RIESKE, 1964; GONG et al., 2011). A expressão desse gene pode apresentar variações de acordo com o estágio de desenvolvimento do inseto e tecido. Para *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) houve diferença no nível de expressão do gene *rieske* nos estádios de desenvolvimento do inseto (GONG et al, 2011). Além disso, o RNAdf, molécula iniciadora do mecanismo de silenciamento, é absorvido pelas células intestinais, dessa forma, a redução da expressão do gene-alvo é observada primeiramente nesse tecido, podendo amplificar-se para o restante do corpo.

A transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Reverse Transcription Quantitative Real Time-PCR* - RT-qPCR) utilizando como molde o RNA, é a técnica mais utilizada para análise da expressão gênica. É altamente precisa, sensível e requer pequenas quantidades de RNA para análise (BUSTIN, 2000;

VANGUILDER et al., 2008; BUSTIN, 2009; DERVEAUX et al, 2010). Pode ser utilizado para comparar o nível de expressão de RNA específico em diferentes populações de amostras, caracterizar o padrão de expressão do gene alvo do estudo, discriminar entre RNAs estritamente relacionados (BUSTIN, 2000).

Apesar das vantagens da utilização do RT-qPCR, cuidados devem ser tomados durante o preparo das amostras e execução da técnica para minimizar erros experimentais. Visto que diversos fatores podem interferir na qualidade e quantidade das amostras a serem testadas, influenciando na precisão dos resultados obtidos e na confiabilidade das conclusões (DERVEAUX et al, 2010).

Para minimizar os erros que podem ocorrer e garantir a confiabilidade dos resultados obtidos é essencial a utilização de genes de referência (BUSTIN et al., 2000; RADONIC et al., 2004; DERVEAUX et al., 2010; TENG et al., 2011). Qualquer resultado da quantificação da expressão gênica é resultado de duas fontes de variação: 1) a variação técnica, induzida experimentalmente e, 2) a verdadeira variação biológica resultante do procedimento experimental. O propósito da normalização dos dados é a remoção da variação técnica, tanto quanto possível, permanecendo somente com as verdadeiras variações biológicas (DERVEAUX et al., 2010).

Genes relacionados à processos celulares básicos são comumente utilizados como genes de referência (FU et al, 2013, GLARE et al., 2002). Porém verifica-se diferenças no nível de estabilidade destes genes em diferentes condições

experimentais, organismos, tecidos e estádios de desenvolvimento (THELLIN et al., 1999; RADONIC et al., 2004; TENG et al, 2011). Portanto, não existe um gene de referência universal, que possa ser utilizado independentemente do organismo alvo do estudo e das condições experimentais (LU et al., 2013; ZHANG et al., 2015; TENG et al, 2011). Dessa forma, é necessária a avaliação meticulosa do perfil de expressão dos genes de referência candidatos nas condições experimentais específicas para a espécie de interesse (THELLIN et al., 1999; FU et al., 2013).

Para verificação da presença de variação biológica da expressão dos genes de referência candidatos de acordo com os tratamentos aplicados é necessário a utilização de métodos de validação dos genes de referência alvo (GLARE et al, 2002). Os métodos ou algoritmos estatísticos mais utilizados para análise da estabilidade dos genes de referência candidatos são: GeNorm, NormFinder, BestKeeper, e o RefFinder para análise conjunta dos resultados obtidos.

O GeNorm é baseado no princípio de que o padrão de expressão de dois genes de referência ideais é constante em determinado grupo de amostras, dessa forma, a estabilidade da expressão (valor M) de cada um dos genes pode ser expressa como a variação média de cada gene em relação a todos os outros genes testados. Quanto menor o valor de M, mais estável é o gene de referência, sendo que o valor máximo aceitável é de 1,5, valores de M acima disto indicam alta instabilidade da expressão gênica (VANDESOMPELE et al., 2002).



O NormFinder emprega um modelo estatístico baseado na Análise de Variância para estimar a variação da expressão de todas as amostras e de cada grupo separadamente. Faz o ranqueamento da estabilidade de cada gene de referência testado, porém, considera cada um independentemente. Da mesma forma que no GeNorm, quanto menor o valor, mais estável é a expressão gênica nas condições testadas (ANDERSEN et al., 2004).

No BestKeeper os valores de Ct (*Cycle Threshold*) são usados para determinar a média geométrica e aritmética, o desvio padrão mínimo e máximo e o coeficiente de variação para cada gene de referência. O desvio padrão é utilizado para determinar os genes de referência mais estáveis. Quanto menor o SD mais estável, o limite superior indicado é  $SD < 1$  (PFAFLL et al, 2004).

Adicionalmente a esses métodos, foi utilizado o Coeficiente de variação, calculado a partir dos valores de Ct, e que pode ser utilizado como um indicador da estabilidade da expressão dos genes candidatos.

O algoritmo RefFinder (fulxie.0fees.us/?ckattempt=1) é baseado no método comparativo  $\Delta Ct$  e nos algoritmos GeNorm, NormFinder e BestKeeper. Este método atribui um peso a cada gene individualmente para calcular a média geométrica. Fornece a média geométrica (MG) e o ranking geral e de cada um dos métodos de validação que compõe o algoritmo.

O objetivo do trabalho foi avaliar se os genes candidatos, *actina*, *fator de alongação 1- $\alpha$*  (*ef1- $\alpha$* ) e

*gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)*, apresentam expressão gênica estável em (i) diferentes estádios de desenvolvimento, (ii) no tecido digestório e restante do corpo e (iii) sob tratamento com RNAdf do gene *rieske* em larvas de *H. armigera*. Visando a validação destes genes para utilização em estudos de silenciamento do gene *rieske* por RNAi como uma nova alternativa de controle deste inseto-praga. Adicionalmente, buscou-se determinar o nível de expressão do gene *rieske* em diferentes estádios de desenvolvimento, no tecido digestório e corporal e obter uma perspectiva da efetividade do RNAdf *rieske* como fator de indução do silenciamento gênico em *H. armigera*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Insetos

O trabalho foi realizado com larvas neonatas de *H. armigera* que foram obtidas do Laboratório de Entomologia da Universidade de Passo Fundo (Rio Grande do Sul, Brasil). As larvas foram obtidas de uma criação em dieta artificial modificada de Greene et al. (1976). Após a formação das pupas, estas foram sexadas e, aproximadamente, 15 fêmeas e 15 machos, foram colocadas em gaiolas de tubo de PVC cobertas com tule para oviposição (Figura 1). Os adultos foram alimentados com solução de mel 10%.

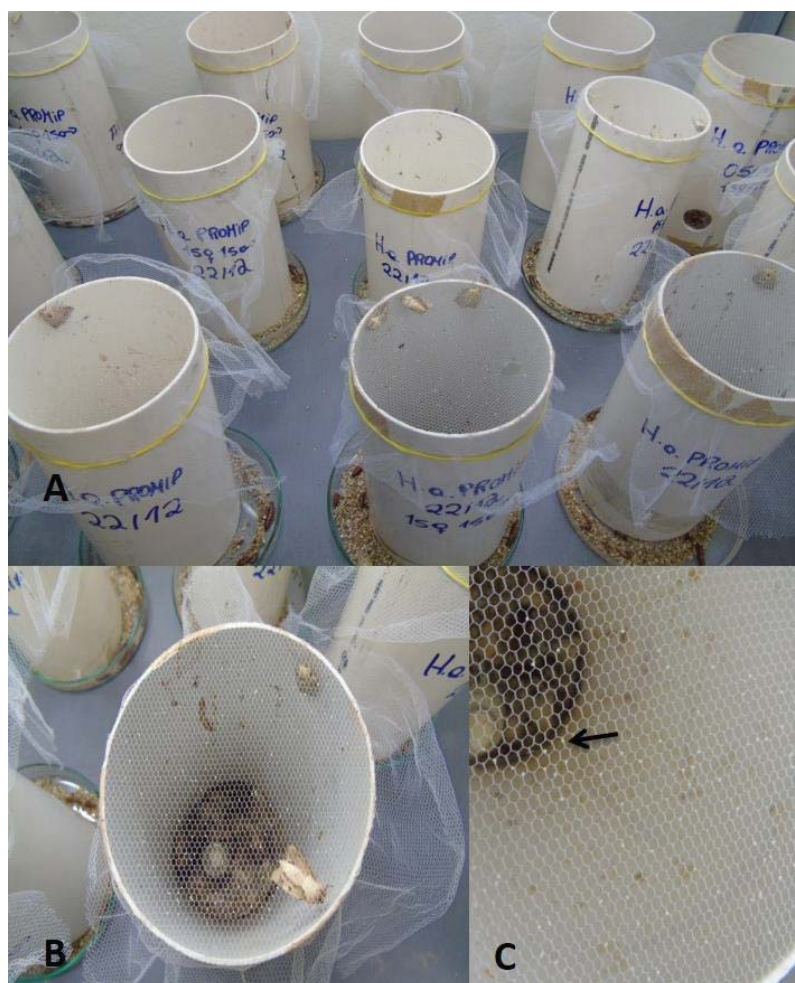


Figura 1 - Criação dos adultos de *Helicoverpa armigera* para reprodução. A) gaiolas de reprodução construídas com tubo de PVC e cobertas com tule; B) fêmea realizando a oviposição sobre o tule; C) ovos de *H. armigera* (seta). FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.

As larvas utilizadas para análise de estabilidade de expressão dos genes de referência nos diferentes estádios de desenvolvimento e tecidos digestório e do restante do corpo foram alimentadas com discos foliares sem RNAdf até o 6º estágio de desenvolvimento com coletas das amostras para extração de RNA em cada um dos instares. Para análise de

estabilidade dos genes de referência candidatos nas larvas submetidas ao silenciamento do gene *rieske* induzido pela alimentação com RNAdf, as larvas foram alimentadas com RNAdf do gene *rieske* até o 3º estágio de desenvolvimento, quando foi realizada a coleta das amostras para extração de RNA.

## 2.2 Estádio de desenvolvimento e tecidos

As larvas neonatas (1º instar) foram individualizadas em placa de Petri (5 cm de diâmetro) com disco de papel filtro no fundo da placa, umedecidos com 200 µl de água ultrapura (Milli-Q) a cada dois dias para manter a umidade do ambiente. As larvas foram mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 25 °C ± 1 °C e umidade de 70% ± 10%. Foram alimentadas com discos foliares de soja convencional não tratada com RNAdf *rieske* e diariamente foi avaliada a troca de estágio de desenvolvimento das larvas pela coleta da cápsula cefálica indicando que a larva passou pela ecdise. Para cada um dos estágios de desenvolvimento avaliados foi realizada a dissecação do sistema digestório, obtendo-se, dessa forma, amostras do tecido do sistema digestório e dos tecidos do restante do corpo das larvas de 2º instar (30 larvas), 3º instar (20 larvas), 4º instar (10 larvas), 5º instar (5 larvas) e 6º instar (5 larvas). As larvas foram coletadas no primeiro dia em que atingiram cada estágio de desenvolvimento. A variação no número de larvas foi devido à necessidade de material a ser coletado para a extração do RNA pois as larvas apresentam

variação no tamanho de acordo com cada estágio de desenvolvimento.

### 2.3 Síntese do RNAdf do gene *rieske*

A produção do RNA dupla fita do gene *rieske* foi realizada no Horticultural Research Laboratory Laboratory, ARS-USDA, Fort Peirce-Fl pela Dr. Magali F. Grando, conforme descrito a seguir.

A sequência de nucleotídeos do cDNA do gene *rieske* de *H. armigera* foi obtida do GenBank-NCBI (acesso: JK145425.1) utilizando a ferramenta tBLASTX EST Database com a sequência do gene *rieske* de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (acesso: JN992290.1). O RNAdf *rieske* foi sintetizado a partir de parte da sequência do gene *rieske* de *H. armigera* (Figura 2).



Figura 2 – Esquema da sequência de cDNA do gene *rieske* e porção do gene a partir da qual foi sintetizado o RNAdf *rieske*. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.

Os primers Forward: GGTGGTTTCTAATGGCCTGA e Reverse: GAAGTGCGTCACCAAGGACT foram desenhados utilizando o software PRIME 3 e utilizados para produção do cDNA a

partir do RNA extraído de *H. armigera* coletada a campo em Passo Fundo no final de 2013.

A extração do RNA do sistema digestório das larvas foi realizada com o *kit* RNeasy (Quiagen, EUA), conforme instruções do fabricante. Para a síntese do cDNA foi utilizado o *kit* OneStep RT-PCR (Quiagen, EUA), de acordo com a indicação do fabricante, utilizando como molde 100 ng de RNA do inseto em uma reação de 25 µl. Foi utilizado o termociclador T-100 (BioRad, EUA) nas seguintes condições: 50°C por 30 min (reação da transcriptase reversa), 95°C por 15 min, seguida por 36 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturação), 65°C por 1 min (anelamento dos *primers*) e 72°C por 1 min (alongamento), sendo a extensão final de 72°C por 10 min.

O produto da amplificação de 343 pb  
GGTGGTTTCTAATGGCCTGAAGCCTCTGGTTGTCGCGC  
ATACACCAGCTGAAAAGGTGTTGGTGCACCCCTTGCCA  
AAAACCTCGACTGTGGAGTCACTGCATGGATCCCTGCC  
TATCCAAGGCTTGAAGGCCAGAGTAAACGGTCGCGGG  
CCAAGCCATGTACGTTTCGCGCATACCGACATCAGCTA  
CCCCGACTTCTCGGCGTACCGTCGCAAGGAGACGCAG  
GATCCCACCTCAAGGGCTAACGACAATGTCGGTGGAC  
GTCAGTCCTTCACTTATCTTATCGCTGGAGCCGGTGGT  
GTGGCCGGTGCGTACGCCGCAAGTCCTTGGTGACGC  
ACTTC foi analisado em gel de agarose 1%. O produto do PCR  
foi ligado em plasmídeo bacteriano e inserido na *Escherichia coli* (Escherich) (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae) para clonagem utilizando o Topo Cloning *Kit/Top10 E. coli* (Invitrogen, EUA). O plasmídeo foi isolado de bactérias

transformadas crescidas *overnight* em meio LB contendo canamicina com o Wizard Plus SV Miniprep Kit (Promega, EUA), sendo o mesmo sequenciado para confirmação da presença do gene *rieske*.

Para produção do molde para a posterior síntese do RNAdf, o cDNA clonado foi amplificado com *primers* contendo o promotor T7 no terminal 5' (TAATACGACTCACTATAGGG) em reação de PCR de 50 µl com o *Kit* Platinum PCR Super Mix (Invitrogen, EUA), conforme as recomendações do fabricante, nas seguintes condições: 95°C por 1 min, seguida por 30 ciclos de 94°C por 20 s, (desnaturação), 56°C por 20 s (anelamento dos *primers*) e 72°C por 1 min (alongamento), sendo a extensão final de 72°C por 10 min. O produto do PCR foi analisado em gel de agarose 1% e a banda de tamanho esperado foi extraída do gel e purificada com o Wizard SV Gel and PCR clean-up system *Kit* (Promega, EUA). A síntese *in vitro* do RNAdf foi realizada com *kit* MEGAscript® T7 (Life Technologies, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do RNAdf foi determinada na absorbância de 260 e 280nm empregando o nanoespectrofotômetro NanoDrop™8000 (Thermo Scientific, EUA) e sua integridade analisado em gel de eletroforese a 1%.

#### **2.4 Administração oral de RNAdf do gene *rieske***

Para o bioensaio, 0,3 µg do RNAdf foram disponibilizados às larvas de *H. armigera* em discos foliares de soja (1cm<sup>2</sup>) nos dias 0, 2, 4 e 6. Como controle negativo foi

utilizada água livre de nucleases. O RNAdf foi diluído em água livre de nucleases com 0,01% de surfactante Silwet<sup>®</sup> para que a solução de RNAdf fosse espalhado de forma uniforme sobre o disco foliar.

As larvas foram mantidas individualizadas em placas de Petri (5 cm de diâmetro), em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 25 °C ± 1 °C e umidade de 70% ± 10%. Quando as larvas atingiram o 3<sup>o</sup> instar, aproximadamente no sexto dia de experimento, foi realizada a dissecação do sistema digestório com coleta das amostras do tecido digestório e do restante do tecido corporal das lagartas vivas. O experimento foi realizado com triplicata biológica, composta por cinco larvas cada.

## **2.5 Seleção dos genes de referência candidatos e desenho dos *primers***

Três genes de referência, *actina*, *ef1-α* e *GAPDH*, foram selecionados para o estudo. Além disso, foi verificado o nível de expressão do gene *rieske* nos diferentes estádios de desenvolvimento, tecido digestório e corporal e sob tratamento com RNAdf *rieske*. As sequências destes genes em *H. armigera* foram obtidos da base de dados do NCBI-National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O programa *Primer3* Plus foi utilizado para desenho dos *primers* do RT-qPCR (Tabela 1). Para confirmação da especificidade dos *primers*, foi realizada a análise da curva de dissociação



(curva de melting) de 65°C à 95°C no RT-qPCR e eletroforese em gel de agarose 1%.

Tabela 1 – Pares de *primers* dos genes de referência e gene *rieske* utilizados para RT-qPCR. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Número de Amplicom acesso	(pb)	Eficiência <sup>a</sup>
<i>Actina</i>	F:GCGACATCAAGGAGAAGCTG R:CGTCGCACTTCATGATGGAG	JF417981.1	231	1,86
<i>Ef1-α</i>	F:CTGATTGTGGCGTCAACAA R:TCGACGTTCCATCCCTTGAA	U20129.1	209	1,83
<i>GAPDH</i>	F:AGGGTGGTGCTAAGAAGGTC R:CCATCCACTGTCTTCTGGGT	JF417983.1	231	1,83
<i>Rieske</i> <sup>b</sup>	F:GGCTGGGTATTTGGCTCCTT R:AGCTGCCATGGACGACAC	JN992290.1	400	1,85

<sup>a</sup> Eficiência de amplificação dos *primers* calculada pelo programa LinReg, utilizando 10 ng de cDNA molde e 10µM de *primers*

<sup>b</sup> *Primers* desenhados fora da área da sequência do RNAdf *rieske*.

## 2.6 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA foi extraído utilizando Trizol (Sigma-Aldrich, EUA), seguindo protocolo de Chomczynski & Mackey (1995). Para quantificação e determinação da pureza das amostras foi utilizado nanoespectrofotômetro NanoDrop<sup>TM</sup>2000 (Thermo Scientific, EUA) e as amostras foram mensuradas na absorbância de A<sub>260</sub> e A<sub>280</sub>. Foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da integridade do RNA extraído. Para eliminação da contaminação com DNA genômico, as amostras foram tratadas com RQ1 RNase Free DNase (Promega, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada utilizando *Kit* High Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, EUA). Para cada amostra, 1

$\mu\text{g}$  de RNA foi utilizado para cada 20  $\mu\text{l}$  de reação. A composição e termociclagem da reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

## 2.7 RT-qPCR

Inicialmente, foram testadas duas concentrações de *primers*, 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ , e duas diluições de cDNA, 10 ng/reação e 5 ng/reação da amostra de sistema digestório das larvas em 3<sup>o</sup> estágio de desenvolvimento para determinar qual a concentração de *primers* e cDNA apresenta maior eficiência de amplificação. Posteriormente para confirmação da eficiência de amplificação foi realizada uma curva padrão utilizando diluições de cDNA em 10X, de 10 ng/reação a 0,001 ng/reação com 10 $\mu\text{M}$  de cada um dos *primers*. Para a curva de diluição foi utilizado um *pool* de cDNA de todas as amostras de tecido digestório e corporal das larvas de segundo à sexto estágio de desenvolvimento. A análise da eficiência de amplificação foi realizada pelo programa LinReg.

O RT-qPCR foi realizado utilizando o *Kit* Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reação de 20  $\mu\text{l}$  utilizou-se 0,5  $\mu\text{l}$  de cada um dos *primers* (forward e reverse) e 2  $\mu\text{l}$  de cDNA. Os ciclos de amplificação foram de 95 °C por 20 s, 40 ciclos de 95 °C por 3 s e 60 °C por 30 s, utilizando equipamento Step One Plus (Thermo Scientific, EUA). Para análise da pureza dos produtos do RT-qPCR foi realizada a análise da curva de dissociação (curva de *Melting*) de 65 °C à 95

°C. Todas as amostras foram amplificadas em triplicatas técnicas.

## 2.8 Análise estatística

Para determinação da estabilidade da expressão dos genes de referência candidatos nas condições bióticas avaliadas: estádios de desenvolvimento, tecido digestivo e corporal e tratamento com RNA*df* do gene *rieske* como fator de indução de silenciamento gênico, foram utilizados os programas GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), NormFinder (ANDERSEN et al., 2004) e BestKeeper (PFAFFL et al., 2004), além da análise da estabilidade pelo coeficiente de variação. Para a análise conjunta das condições bióticas testadas foi utilizado o programa RefFinder, que leva em consideração os programas GeNorm, NormFinder, BestKeeper e Delta CT para produzir um ranking final.

Para todos os programas, os dados foram exportados para o Excel e configurados de acordo com as especificações de cada um dos programas de validação utilizados. Para os algoritmos GeNorm e NormFinder, os valores de Ct foram transformados pelo método  $\Delta Ct$ :  $Q = E^{\Delta(Ct)}$ , onde E: eficiência da amplificação de cada amplicon,  $\Delta Ct$ : menor valor de Ct-valor de Ct da amostra (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Para o BestKeeper, a eficiência de amplificação e os valores de Ct foram utilizados no software para análise dos dados. Para o RefFinder foram utilizados somente os valores de Ct, da mesma

forma, para análise do Coeficiente de variação foram utilizados somente os valores de Ct.

## **2.9 Análise da expressão gênica do gene alvo *rieske***

A expressão relativa do gene *rieske*, gene alvo do silenciamento via RNAdf, foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) para os diferentes estádios de desenvolvimento no tecido digestório e corporal (sem tratamento com RNAdf) e no tecido digestório e corporal das larvas em 3º estágio de desenvolvimento que foram alimentadas com RNAdf *rieske*. A análise da expressão gênica foi realizada com os três genes de referência candidatos e com os dois genes que apresentaram melhores resultados, a fim de verificar variações no nível de expressão decorrentes da utilização de genes de referência com baixo nível de estabilidade nas condições experimentais testadas.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Eficiência de amplificação do PCR e perfil de amplificação dos genes de referência**

As amostras de RNA utilizadas apresentaram a relação de absorvância 260/280 entre 1,8 e 2,2, comprovando a qualidade das amostras de RNA. A eficiência da amplificação foi calculada pelo programa LinReg. Utilizando 10  $\mu$ M de *primer* e 10 ng de cDNA/reação, a eficiência de amplificação foi

mais homogênea entre os *primers* testados, sendo 1,86, 1,84, 1,86 e 1,87 para os genes de referência, *actina*, *ef1- $\alpha$*  e *GAPDH*, e o gene alvo *rieske*, respectivamente (Figura 3).

A curva padrão foi construída utilizando diluições de 10 vezes partindo da concentração inicial de 10ng/reação. A eficiência da amplificação calculada pelo LinReg variou de 1,86 a 1,91 para *actina*, 1,83 a 1,88 para *ef1- $\alpha$* , 1,83 a 1,87 para *GAPDH* e 1,85 a 1,89 para *rieske*. A eficiência da amplificação expressa em percentual variou de 87 à 91%.

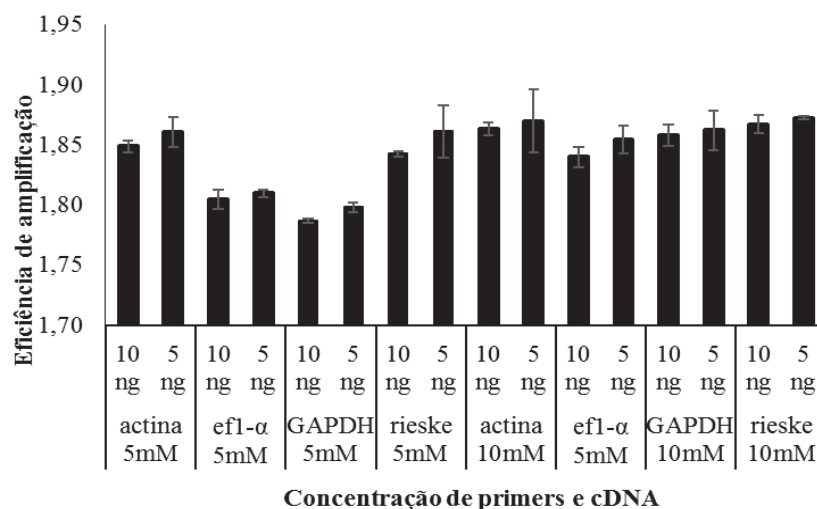


Figura 3 – Eficiência de amplificação dos *primers* da *actina*, *ef1- $\alpha$* , *GAPDH* e *rieske* nas diluições de 5 e 10 $\mu$ M de *primers* e 10 e 5 ng de cDNA calculada pelo programa LinReg. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Nas barras está indicado o desvio padrão.

A especificidade dos genes candidatos foi confirmada pela presença de um único pico na curva de dissociação (*melting curve*). A eletroforese em gel de agarose

confirmou a presença de somente um produto de amplificação de tamanho esperado.

O nível de expressão dos genes de referência e do gene alvo *rieske* é demonstrado pelo Ct, que é definido como o número de ciclos necessários alcançar um patamar específico (*threshold*) de detecção e é inversamente relacionado com o nível de expressão gênica. Avaliando cada condição biótica isoladamente cabe destacar a maior variação no valor de Ct do gene *actina* em todas as condições avaliadas, especialmente nos diferentes tecidos (Figura 4 A, B e C). Considerando o experimento total, o gene mais expresso foi *efl- $\alpha$*  (Ct: 18,05), seguido de *actina*, *GAPDH* e *rieske* com valores de Cts de 18,34; 20,38 e 22,6, respectivamente (Figura 4 D).

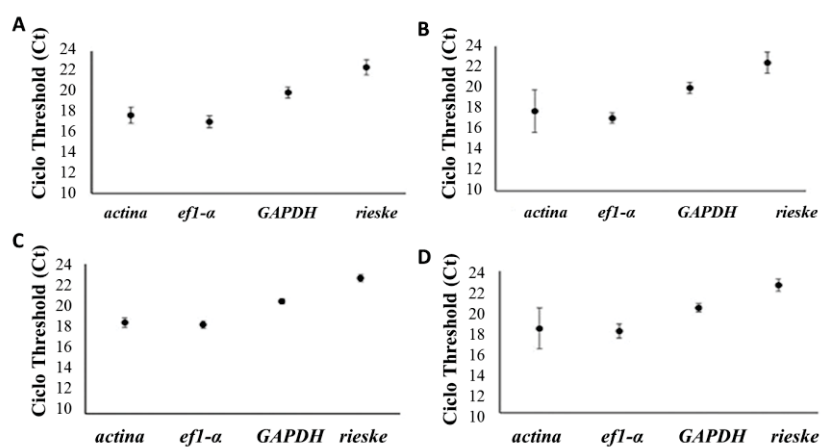


Figura 4 - Perfil do nível de expressão dos genes de referência de *Helicoverpa armigera* dado pelo valor do *Ciclo Threshold* (Ct) de cada um dos genes testados em cada condição biótica isoladamente: estádios de desenvolvimento (A); tecidos (B) e tratamento com RNAdf do gene *rieske* (C) e, considerando o experimento total (D). FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Nas barras está indicado o desvio padrão.

### 3.2 Estabilidade da expressão dos genes de referência candidatos

A variação encontrada na expressão gênica sugere a necessidade de avaliação da estabilidade da expressão dos genes candidatos em cada uma das condições experimentais nas quais as larvas de *H. armigera* foram submetidas.

O RT-qPCR é uma técnica eficiente para a quantificação gênica devido a sua sensibilidade e precisão, porém é altamente influenciada por variação entre as amostras, seja de ordem quantitativa ou qualitativa (BUSTIN, 2000; FLEIGE & PFAFFL, 2006). Variações nos resultados da expressão gênica podem ser introduzidos pelo procedimento de coleta e extração do RNA, síntese do cDNA e pelo preparo e procedimentos do RT-qPCR. Essas variações podem ser evitadas com cuidados na execução de experimentos de RT-qPCR, porém, é impossível eliminar todas as variações intrínsecas dos procedimentos de RT-qPCR (TENG et al., 2011). Dessa forma, é indispensável a utilização de genes de referência para a normalização das amostras (BUSTIN, 2000).

Genes envolvidos em funções celulares básicas, incluindo *actina* e *GAPDH*, são comumente utilizados como genes de referência em diversos organismos e condições experimentais (FU et al., 2013). Porém, não existe um gene de referência universal que possa ser aplicado para todos os organismos e tratamentos (TENG et al., 2011; LU et al., 2013; ZHANG et al., 2015). Portanto, é essencial que os genes de referência candidatos sejam validados nas condições

experimentais específicas, a fim de evitar erros na quantificação da expressão gênica (CHANDRA et al., 2014).

A melhor forma de determinar um bom gene de referência nas condições experimentais específicas, garantindo a correta quantificação da expressão dos genes alvo, é validando a estabilidade da expressão por métodos e algoritmos (TENG et al., 2011).

Geralmente utilizam-se vários métodos de análise da estabilidade da expressão dos genes candidatos para que se tenha maior confiabilidade nos dados, uma vez que, na mesma condição experimental, a estabilidade e o ranqueamento dos melhores genes de referência pode variar de acordo com o método de análise utilizado (CHANDRA et al., 2014).

Para análise da estabilidade dos genes de referência candidatos, *actina*, *ef1- $\alpha$*  e *GAPDH* utilizou-se os programas GeNorm (VANDESOMPLE et al., 2002), NormFinder (ANDERSEN et al., 2004) e BestKeeper (PFAFFL et al., 2004). Cada um utiliza métodos diferentes de análise da estabilidade e são comumente utilizados pois o resultado conjunto destes programas fornece resultados mais robustos sobre a estabilidade dos genes candidatos. Adicionalmente foi calculado o coeficiente de variação que indica o percentual de variação entre as amostras como um indicador da estabilidade de expressão dos genes. O algoritmo RefFinder fornece uma análise conjunta dos principais programas de validação, GeNorm, NormFinder, BestKeeper e Delta Ct e atribui um peso a cada um dos genes de referência testados e faz o ranqueamento geral, dessa forma, utilizando estes métodos de análise foi possível obter resultados



consistentes do perfil de expressão e estabilidade de cada um dos genes de referência candidatos nos estádios de desenvolvimento, tecido digestório e corporal e sob tratamento com RNAdf *rieske*.

### 3.2.1 Estádios de desenvolvimento larval de *H. armigera*

O gene com maior estabilidade de expressão nos diferentes estádios de desenvolvimento calculado pelos métodos GeNorm e Normfinder foi o gene *efl- $\alpha$*  (Figura 5 A, B).

O GeNorm calcula o valor de min como uma medida de estabilidade. Quanto menor o valor de min maior é a estabilidade de expressão do gene. Genes com valores de min abaixo de 1,5 são considerados estáveis (VANDESOMPELE et al., 2002). Portanto, os três genes testados estão dentro desta categoria, mas o *efl- $\alpha$*  apresentou menos variação na sua expressão ao longo do desenvolvimento larval de segundo ao sexto ínstar. O NormFinder calcula um valor relativo de estabilidade e esse gene obteve o valor de 0,397.

Pelo método BestKeeper a estabilidade dos genes *GAPDH* e *efl- $\alpha$*  foram semelhantes (Figura 5 C). Quando o coeficiente de variação foi empregado, o gene *GAPDH* se mostrou o mais estável (Figura 5 C, D).

O gene da *actina* foi o menos estável ao longo do desenvolvimento larval de *H. armigera*, independentemente do método utilizado.

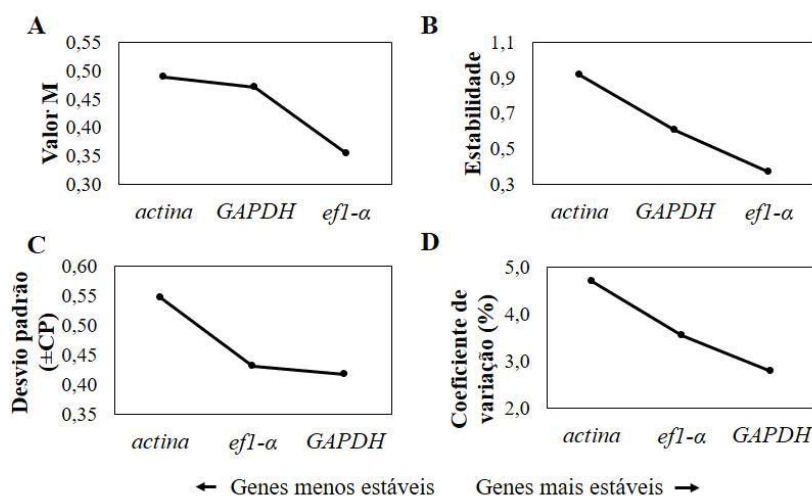


Figura 5 - Estabilidade da expressão dos genes de referência candidatos em larvas de *Helicoverpa armigera* do 2<sup>o</sup> ao 6<sup>o</sup> instar, calculado pelo GeNorm (A), NormFinder (B), BestKeeper (C) e coeficiente de variação (D). FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.

### 3.2.2 Tecido

O gene *efl-α* foi indicado como o gene mais estavelmente expresso entre os dois tecidos larval avaliados quando os algoritmos GeNorm e NormFinder foram empregados no cálculo da estabilidade (Figura 6 A, B). No entanto o BestKeeper e o CV indicaram que os genes *efl-α* e *GAPDH* são igualmente estáveis entre os tecidos (Figura 6 C, D).

A *actina* foi o gene com menor estabilidade, ou seja, foi o gene mais diferencialmente regulado nos tecidos no sistema digestório e no restante do corpo, apresentando diferença de, aproximadamente um ponto no valor da estabilidade, em relação à média dos dois genes mais estáveis de acordo com o GeNorm, NormFinder e BestKeeper. *Actina* não é

aceitável como gene de referência para os tecidos avaliados ultrapassando 1,5 no valor de min pelo GeNorm. Ainda, o percentual de variação na expressão chegou a 11,6% para *actina* enquanto para o *GAPDH* e *ef1- $\alpha$*  a variação média foi de 2,7% (Figura 6).

Os resultados permitem concluir que existe maior variação na expressão dos genes entre os tecidos do que entre os estádios larval.

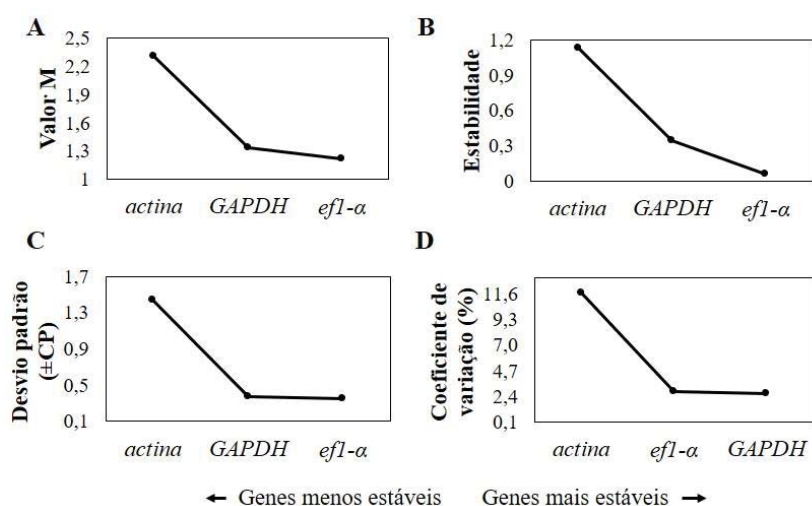


Figura 6 - Estabilidade da expressão dos genes de referência candidatos em larvas de *Helicoverpa armigera* no tecido digestório e no restante do corpo calculado pelo GeNorm (A), NormFinder (B), BestKeeper (C) e coeficiente de variação (D). FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.

### 3.2.3 Tratamento das larvas de 3<sup>o</sup> instar com RNAdf do gene *rieske* ofertado oralmente

A alimentação das larvas com RNAdf do gene *rieske* não interferiu no padrão de estabilidade dos genes de referência

candidatos. Os genes mais estáveis pelo método GeNorm e NormFinder foram o *ef1- $\alpha$*  e *GAPDH* (Figura 7 A, B), os dois genes apresentaram nível de estabilidade semelhante. Pelo BestKeeper e coeficiente de variação o gene mais estável foi *GAPDH* (Figura 7 C, D).

O gene da *actina* apresentou menor estabilidade de expressão entre lagartas tratadas e não tratadas com 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de RNAdf do gene *rieske* sobre discos foliares de soja conforme indicado pelos quatro métodos empregados (Figura 7).

Estes resultados indicam que a *actina* seria o gene menos recomendado para normalizar a expressão do gene alvo a ser silenciado pelo sistema de RNA de interferência.

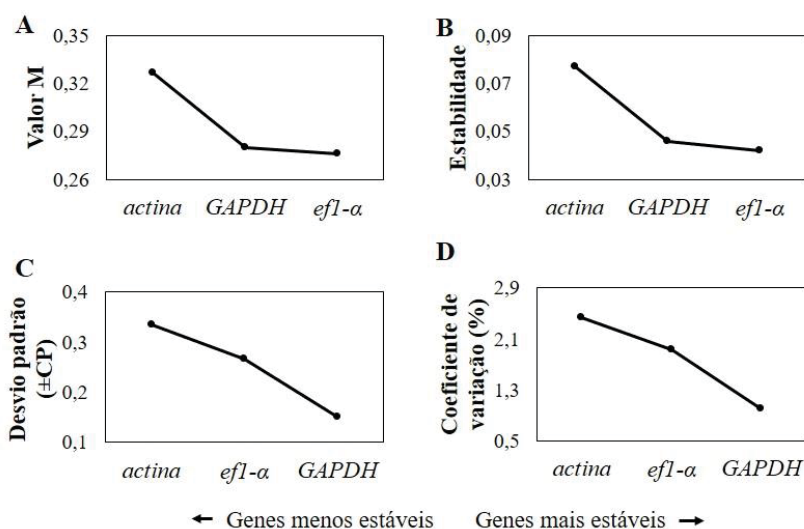


Figura 7 - Estabilidade da expressão dos genes de referência candidatos em larvas de *Helicoverpa armigera* submetidas ao silenciamento do gene *rieske* induzido pela alimentação com RNAdf-*rieske* calculado pelos métodos GeNorm (A), NormFinder (B), BestKeeper (C) e coeficiente de variação (D). FAMV/UPF, Passo Fundo, RS

A variação na expressão gênica observada foi pequena quando as lagartas foram alimentadas quatro vezes com  $0,3 \text{ ug.cm}^{-2}$  de RNAdf em comparação com a variação observada nos outros tratamentos (estádios de desenvolvimento e tecidos). Essa concentração de RNAdf administrada sobre discos foliares de soja se mostrou suficiente para alterar a expressão do gene *rieske* e causar mortalidade nas lagartas de *H. armigera* (Capítulo II). A indução do silenciamento afetou numa menor extensão a expressão dos genes de referência, mas o gene da *actina* continua sendo o menos estável nessas condições.

O *ranking* da estabilidade de expressão de cada gene de referência está mostrado na Tabela 2. Independentemente do método utilizado, *ef1- $\alpha$*  e *GAPDH* foram os genes mais estáveis nos estádios de desenvolvimento, tecido digestório e do restante do corpo e sob tratamento com RNAdf do gene *rieske*. *Actina* foi o gene com menor estabilidade de expressão em todas as condições avaliadas.

Os métodos utilizados para análise da estabilidade da expressão dos genes de referência são baseados em diferentes modelos matemáticos para o cálculo da estabilidade, devido a isso, é comum encontrar discrepância nos resultados dependendo do método utilizado (FU et al., 2013; COSTA et al., 2015; LU et al., 2015; SHAKEEL et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Tabela 2 - Estabilidade da expressão dos genes de referência candidatos em larvas de *Helicoverpa armigera* em diferentes condições bióticas, calculados pelo GeNorm, NormFinder, BestKeeper, BestKeeper e Coeficiente de variação. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS

Condições bióticas	Gene de referência	GeNorm			NormFinder			BestKeeper			CV (%)
		Estabilidade	Ranking	Estabilidade	Ranking	Estabilidade	Ranking	Estabilidade	Ranking		
Estádios de desenvolvimento	<i>actina</i>	0,489	3	3	3	0,547	3	4,697	3	3	
	<i>ef1-<math>\alpha</math></i>	0,354	1	1	1	0,431	2	3,530	2	2	
	<i>GAPDH</i>	0,471	2	2	2	0,417	1	2,779	1	1	
Tecidos	<i>actina</i>	2,309	3	3	3	1,444	3	11,660	3	3	
	<i>ef1-<math>\alpha</math></i>	1,215	1	1	1	0,349	1	2,853	2	2	
	<i>GAPDH</i>	1,338	2	2	2	0,379	2	2,677	1	1	
Tratamento com RNAdf <i>rieske</i>	<i>actina</i>	0,327	3	3	3	0,335	3	2,435	3	3	
	<i>ef1-<math>\alpha</math></i>	0,276	1	1	1	0,266	2	1,935	2	2	
	<i>GAPDH</i>	0,280	2	2	2	0,150	1	1,008	1	1	

O RefFinder é uma ferramenta de análise que combina quatro métodos, GeNorm, NormFinder, BestKeeper e  $\Delta Ct$ . Este algoritmo atribui um peso a cada gene individualmente para calcular a média geométrica (MG), que permite avaliar de forma abrangente e ranquear os genes de referência. É uma das alternativas para uma análise mais ampla da estabilidade da expressão gênica, uma vez que, utiliza a combinação de quatro diferentes métodos de análise.

Na análise geral do RefFinder, considerando todas as condições experimentais (tecido digestório e corporal, estádios de desenvolvimento e tratamento com RNAdf *Rieske*), o melhor gene de referência foi o *efl- $\alpha$*  (MG: 1,19), seguido de *GAPDH* (MG: 1,41) e a *actina* foi o gene com menor estabilidade (MG: 3,0) (Tabela 3).

Tabela 3 – *Ranking* da estabilidade dos genes de referência candidatos de *Helicoverpa armigera* calculado pelo RefFinder, considerando o experimento completo. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS

<b>Método</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Delta CT	<i>Efl-<math>\alpha</math></i>	<i>GAPDH</i>	<i>Actina</i>
BestKeeper	<i>GAPDH</i>	<i>Efl-<math>\alpha</math></i>	<i>Actina</i>
Normfinder	<i>Efl-<math>\alpha</math></i>	<i>GAPDH</i>	<i>Actina</i>
Genorm	<i>Efl-<math>\alpha</math> GAPDH</i>		<i>Actina</i>
<b>Ranking recomendado</b>	<b><i>Efl-<math>\alpha</math></i></b>	<b><i>GAPDH</i></b>	<b><i>Actina</i></b>

Considerando estádios de desenvolvimento, tecido digestório e corporal e sob tratamento de RNAdf, os genes de referência mais estáveis pelo cálculo do RefFinder foram: *GAPDH* para estádios de desenvolvimento e tecidos, e *efl- $\alpha$*  para tratamento com RNAdf (dados não mostrados). *Actina* foi o

gene menos estável para todas as condições experimentais testadas e todos os métodos de análise de estabilidade utilizados.

Baseado nas análises apresentadas acima, dentre os genes de referência candidatos, *efl- $\alpha$*  e *GAPDH* foram os que apresentaram maior estabilidade nos diferentes estádios de desenvolvimento, tecido digestório e corporal e quando as larvas foram alimentadas com o RNAdf do gene *rieske*.

Apesar da *actina* e *GAPDH*, genes envolvidos em funções celulares básicas, serem utilizados de forma rotineira em laboratórios de biologia molecular como genes de referência, estudos demonstram que o número de transcritos destes genes podem ser afetados por diversos fatores (GLARE et al., 2002). Podendo, dessa forma, apresentar diferenças no perfil de expressão de acordo com os tratamentos utilizados e espécies alvo do estudo (SELVEY et al., 2001; GLARE et al., 2002; TENG et al., 2011; CHANDRA et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

A *actina* codifica uma proteína do citoesqueleto, é expressa em níveis moderadamente abundantes na maioria dos tipos celulares e participa de muitos processos celulares incluindo contração muscular, divisão e motilidade celular e citocinese (BUSTIN, 2000, LU et al., 2013,). Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que a *actina* foi o gene menos estável em todas as condições experimentais testadas, especialmente para os diferentes tecidos testados. A baixa estabilidade da expressão da *actina* no tecido digestório e corporal está relacionada com a função do gene envolvido na estrutura do citoesqueleto.



Resultados semelhantes foram encontrados para o lepidóptero *P. xylostella* (FU et al., 2013). Além disso, em diferentes estádios de desenvolvimento, a *actina* apresentou variação no perfil de expressão e estabilidade em quatro insetos da ordem Lepidoptera. Para *P. xylostella* e *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) foi o gene mais estável, entre seis genes de referência candidatos, enquanto para *S. exigua* e *Bombix mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) foi o gene menos estável (TENG et al., 2011). Da mesma forma, a *actina* foi o gene menos estável para *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) considerando diferentes estádios de desenvolvimento e tecidos (LU et al., 2013).

Para *H. armigera*, a *actina* não foi recomendada como gene de referência em outros estudos por apresentar menor estabilidade considerando fatores bióticos (CHANDRA et al., 2014; ZHANG et al., 2015) e abióticos (SHAKEEL et al., 2015).

O *GAPDH*, gene envolvido no metabolismo de carboidrato para produção de energia (SCHARLAKEN et al., 2008), é amplamente utilizado como gene de referência para controle interno do nível de expressão. Porém, estudos revelam variação na expressão deste gene de acordo com as condições experimentais (GLARE et al., 2002).

Considerando a análise geral de todo o experimento pelo RefFinder, *GAPDH* foi o segundo gene com maior estabilidade. O resultado está de acordo com o encontrado para outros insetos da ordem Lepidoptera. Foi o gene com maior estabilidade em diferentes tecidos para *B. mori* (TENG et al.,

2011), em diferentes estádios de desenvolvimento para *S. exigua* e *S. litura* (TENG et al., 2011; LU et al., 2015) e sob fatores abióticos para *P. xylostella*, *H. armigera* e *S. litura* (FU et al., 2013, LU et al., 2013, SHAKEEL et al., 2015).

*Ef1- $\alpha$* , que produz proteínas responsáveis pela catalisação de RNAt-aminoacil no sítio acceptor do ribossomo exercendo um importante papel na tradução (FU et al., 2013), foi o gene mais estável no ranking geral pela análise do RefFinder considerando todo o experimento.

*Ef1- $\alpha$*  não era muito utilizado como gene de referência, no entanto, recentemente, estudos tem demonstrado sua estabilidade de expressão e potencial de utilização como gene de referência, especialmente em insetos. Foi o gene mais estável nas condições bióticas, estádios de desenvolvimento, tecidos e população, em *P. xylostella* (FU et al., 2013). Para *S. litura*, *ef1- $\alpha$*  apresentou a segunda mais estável expressão em diferentes populações e em larvas submetidas ao estresse de temperatura (LU et al., 2013). Em larvas de *Sesamia inferens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas com inseticidas, foi o segundo gene mais estável (LU et al., 2015).

No entanto, para *S. exigua*, *ef1- $\alpha$*  foi um dos genes que se destacaram pela menor estabilidade na expressão (ZHU et al., 2014). Resultados menos satisfatórios também foram encontrados para *H. armigera* utilizando-se este gene (ZHANG et al., 2015, CHANDRA et al., 2014).

A variação na estabilidade da expressão dos genes de referência entre diferentes trabalhos, organismos ou mesmo entre diferentes tratamentos, ressalta a necessidade da validação

dos genes de referência candidatos nas condições experimentais específicas e para a espécie alvo para que se tenha confiabilidade nos resultados da expressão do gene alvo do estudo.

### **3.3 Perfil de expressão e silenciamento do gene alvo *rieske***

A análise da expressão do gene *rieske* nos estádios de desenvolvimento, tecidos digestório e do restante do corpo e sob administração oral do RNAdf foi realizado utilizando *efl- $\alpha$*  e *GAPDH*, os genes mais estáveis nas condições bióticas testadas.

No sistema digestório a menor expressão do gene *rieske* ocorre no 2º instar, no 3º, 4º e 5º instar a expressão é maior em relação ao 2º instar, porém, não há diferença estatística no nível de expressão nestes instares. A maior expressão ocorreu no 6º instar (Figura 8 A).

Nos tecidos que constituem o restante do corpo não houve diferença estatística na expressão do gene *rieske* nos diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 8 B).

A alimentação das larvas de *H. armigera* com discos foliares de soja contendo o RNAdf *rieske* até o sexto dia de experimento, ou seja, até as larvas atingirem o terceiro estágio de desenvolvimento, causou redução no nível de expressão do gene, indicando sua atuação no silenciamento gênico.

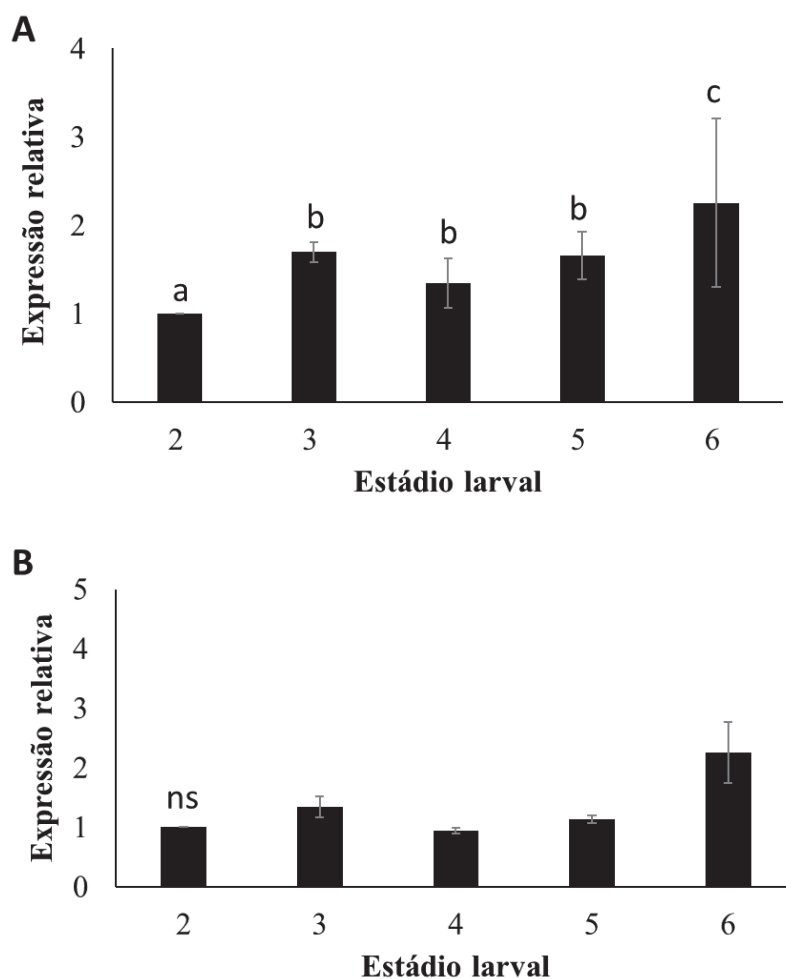


Figura 8 – Expressão relativa do gene *rieske* do 2º ao 6º estágio larval em *Helicoverpa armigera* no tecido digestório (A) e corporal (B). FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Colunas seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste T. Nas barras está indicado o erro padrão da média.

No sistema digestório foi observado 10% de silenciamento (Figura 9 A). Nas amostras de tecido corporal, a expressão relativa do gene *rieske* foi 25% menor em relação ao controle não tratado com RNAdf (Figura 9 B).

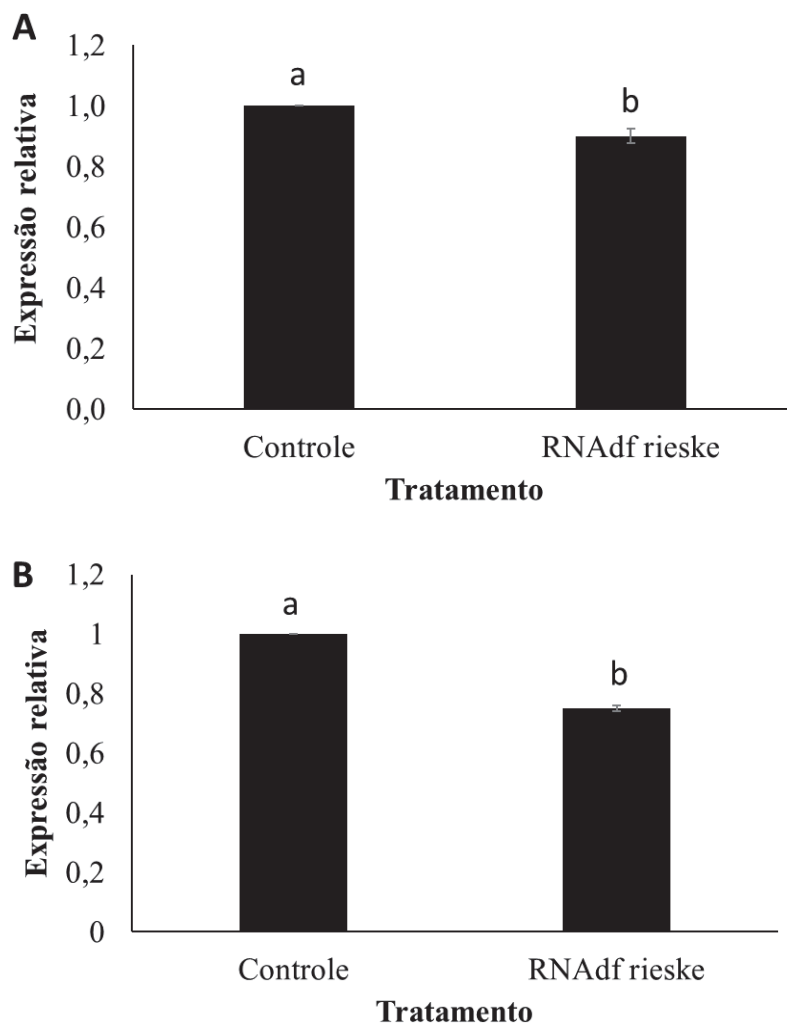


Figura 9 – Expressão relativa do gene *rieske* nas larvas de *Helicoverpa armigera* em 3<sup>o</sup> estágio larval alimentadas com RNAdf *rieske* e controle. Amostras do tecido digestório (A) e corporal (B). FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Colunas seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste T. Nas barras está indicado o erro padrão da média.

Os dados obtidos, apesar do experimento de pequeno porte, já sugerem que ocorre amplificação do silenciamento, uma vez que, a redução da expressão do gene

*rieske* no tecido corporal foi de 25%. Apesar de não ser bem conhecido o mecanismo de amplificação do silenciamento em insetos, estudos demonstram a ocorrência deste mecanismo em lepidópteros (KUMAR et al., 2009; ASOKAN et al., 2013; ASOKAN et al., 2014; MAMTA et al., 2016).

É importante ressaltar também a efetividade do silenciamento do gene *rieske* mediante a alimentação das larvas de *H. armigera* com RNAdf *rieske*. O potencial do gene *rieske* como alvo do silenciamento gênico mediado por RNAi já havia sido demonstrado para *P. xylostella* (GONG et al., 2011) e *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae), psilídeo vetor das bactérias que causam o *greening*, uma das principais doenças que afetam a citricultura (RAMOS et al., 2014). Porém, para *H. armigera* é a primeira vez que é demonstrado o silenciamento do gene *rieske* pelo mecanismo de RNAi induzido pela alimentação das larvas com RNAdf *rieske*, fato que motiva novos estudos sobre a ocorrência do silenciamento do gene *rieske* em *H. armigera* e os efeitos da redução da expressão gênica no fenótipo dos insetos.

Para *H. armigera*, vários genes podem ser utilizados para normalização dos dados RT-qPCR (SHAKEEL et al., 2015), sendo alguns deles já testados e validados para este inseto, entre eles se encontram principalmente genes responsáveis pela produção do RNAr 18S e 28S e proteínas ribossomais e  $\beta$ -tubulina (CHANDRA et al., 2014; SHAKEEL et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Estes dados servem como apoio na escolha dos genes a serem utilizados, mas é necessário que seja feita a validação nas condições experimentais

específicas, uma vez que, há grande dificuldade de determinar um gene que possa ser utilizado independente do tratamento a ser aplicado (LU et al., 2013; LU et al., 2015; SHAKEEL et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

#### 4 CONCLUSÕES

Os genes de referência mais estáveis para *H. armigera* em diferentes estádios de desenvolvimento, tecido digestório e restante do corpo e sob tratamento das larvas com RNAdf do gene *rieske* são *ef1- $\alpha$*  e *GAPDH*, validando sua utilização para estudos de expressão gênica em larvas submetidas ao silenciamento gênico pela alimentação com RNAdf do gene *rieske*. Por apresentar menor estabilidade, não é recomendado o uso da *actina* para normalização dos dados de RT-qPCR em *H. armigera*.

## CAPÍTULO II

### SILENCIAMENTO DO GENE *rieske* PELA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE RNA DUPLA FITA VISANDO O CONTROLE DO INSETO-PRAGA *Helicoverpa armigera* VIA RNA DE INTERFERÊNCIA

Cássia Canzi Ceccon<sup>1</sup>

**RESUMO:** RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional e tem sido estudado como uma alternativa para controle de insetos-praga pelo silenciamento de genes vitais para a sobrevivência do inseto. *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) é inseto-praga de diversas culturas de importância econômica e é especialmente problemática pela dificuldade de controle com inseticidas e plantas geneticamente modificadas expressando os genes *cry*. Neste contexto, os objetivos do trabalho foram: 1) avaliar o potencial do RNAdf correspondente à sequência do gene *rieske* (RNAdf *rieske*) de *H. armigera* para indução do silenciamento gênico, e; 2) determinar se o silenciamento do gene *rieske* pode induzir significativa mortalidade em *H. armigera*. Inicialmente foi realizado experimento para determinar a dose de RNAdf do gene *rieske* que induz maior taxa de mortalidade e/ou afeta o desenvolvimento larval. As 3 doses testadas foram:

---

<sup>1</sup> Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Produção e Proteção de Plantas.



0,03, 0,3 e 3,0  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de RNAdf *rieske*, aplicadas na superfície dos discos foliares de soja. As larvas neonatas foram alimentadas nos dias 0, 2 e 4 com discos foliares tratados com RNAdf *rieske*. Água livre de nucleases foi utilizada como controle. Diariamente foi avaliado a mortalidade e consumo, e a cada 3 dias, a partir do 6º dia, foi obtido o peso das larvas. A dose de 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de RNAdf *rieske* induziu a maior mortalidade (41%), a maior redução no consumo (71%) e a maior redução no ganho de peso (74%). No segundo experimento, somente 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de RNAdf *rieske* foi disponibilizado às larvas. Novos discos tratados com RNAdf foram disponibilizados a cada dois dias até o 12º dia. Como controle foi utilizado água livre de nucleases e o RNAdf-T, que possivelmente não tem relação com qualquer gene de *H. armigera*. Diariamente foi avaliado a mortalidade e o consumo, a cada 3 dias, a partir do 6º dia, foi realizada a pesagem das larvas. O nível de expressão do gene *rieske* foi mensurado por RT-qPCR das larvas em 3º e 6º instar. Até o 5º dia as larvas eram alimentadas exclusivamente com discos foliares tratados com RNAdf e houve diferença significativa na mortalidade e no silenciamento do gene *rieske* em relação aos controles, indicando o potencial do RNAdf do gene *rieske* para o controle de *H. armigera*. Porém, os resultados obtidos a partir do 5º dia, quando a alimentação das larvas foi alternada com discos foliares tratados e não tratados, não houve diferença significativa na mortalidade e silenciamento do gene *rieske*, indicando a necessidade de fornecimento contínuo do RNAdf.

**Palavras-chave:** expressão gênica, mortalidade, consumo, desempenho biológico.

**INTERFERENCE RNA GENE SILENCING BY ORAL  
ADMINISTRATION OF *rieske* DOUBLE STRANDED  
RNA FOR *Helicoverpa armigera* CONTROL**

**ABSTRACT:** RNA interference (RNAi) is a post-transcriptional gene silencing mechanism and has been studied as a new method of insect pest control by targeting and knocking-out expression of genes vital for insect survival. *Helicoverpa armigera* is an insect pest of diverse types of economically important crops and especially problematic due to difficulty control with chemical insecticides and genetically modified plants expressing *cry* genes. In this context, the objectives were to: 1) evaluate the potential of dsRNA matching the sequence of the *H. armigera rieske* gene (dsRNA *rieske*) to induced gene silencing, and; 2) determine if successful silencing of the *rieske* gene can induce significant mortality in *H. armigera*. Initially, an experiment was performed to determine the dose of *rieske* dsRNA that induces the highest mortality and/or most significantly affects larval development. The three tested doses were: 0,03, 0,3 and 3,0  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  dsRNA *rieske*, applied to the surface of leaf discs. In the first experiment, the neonate larvae were fed on days 0, 2 and 4, with soybean leaf discs containing *rieske* dsRNA. Nuclease-free water was used as a control. Mortality and consumption were evaluated daily and every 3 days after day six the larvae mass

was recorded. The dose of  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  of dsRNA *rieske* induced the highest mortality (41%), the greatest reduction in consumption (71%) and the greatest reduction in weight gain (74%). In the second experiment, only  $0,3 \mu\text{g}$  of dsRNA *rieske*/cm<sup>2</sup> soybean leaf disc was fed to larvae. New dsRNA treated discs were provided every two days until the 12<sup>th</sup> day. Nuclease-free water and a dsRNA that presumably does not match any *H. armigera* gene sequences (dsRNA-T) were used as controls. Larvae mortality and consumption were evaluated daily. Every three days after the day six larvae weight was also recorded. The expression level of the *rieske* gene was measured by RT-qPCR at the 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> instar. Up to the fifth day the larvae were fed exclusively with leaf discs treated with dsRNA and there was a significant difference in mortality and *rieske* gene silencing compared to controls, indicating the potential for using dsRNA *rieske* for *H. armigera* control. However, after the fifth day a time when the insects were alternately fed dsRNA treated and untreated leaf discs, there was no significant difference in mortality and silencing of the *rieske* gene, indicating the need of continuous supply of dsRNA.

**Key words:** gene expression, mortality, consumption, biological performance.

## 1 INTRODUÇÃO

O RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo de regulação gênica a nível pós-transcricional altamente conservado em eucariotos (HANNON, 2002; BEZERIKOV,

2011). O processo de silenciamento mediado por RNAi é desencadeado pela molécula de RNA dupla fita (RNAdf), fator de iniciação do silenciamento gênico (FIRE et al., 1998).

Esse mecanismo natural de silenciamento gênico controla diversos processos biológicos como defesa a vírus, desenvolvimento celular, diferenciação, apoptose e movimentação dos transposons (BARTEL, 2004; QI & HANON, 2005; BURAND & HUNTER, 2013).

Após seu descobrimento, o RNAi foi amplamente utilizado em estudos visando a compreensão do mecanismo de RNAi, além de estudos de regulação e função gênica (YANG et al., 2011). Este mecanismo de silenciamento gênico tem revolucionado a genômica funcional, sendo uma ferramenta poderosa da genética reversa permitindo o *knock down* de genes para investigação de sua função (KIM et al., 2015).

Em insetos, os estudos do mecanismo RNAi estão relacionados ao silenciamento da expressão tanto de genes endógenos, quanto de genes de parasitas e patógenos invasores, como os vírus e elementos genéticos móveis ou transposons (BURAND & HUNTER, 2013). Além disso, este mecanismo é considerado uma nova e promissora alternativa para o controle de insetos pelo silenciamento de genes específicos dos insetos-praga alvo (PRICE & GATEHOUSE, 2008, YANG, 2011; LIM et al., 2016). A aplicação de RNAdf desencadeando o silenciamento pelo mecanismo de RNAi tem apresentado resultados promissores podendo ser considerado um potencial novo bioinseticida (ZHANG et al., 2015).

*Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) se destaca como inseto-praga de diversas culturas se alimentando de mais de 170 espécies de plantas hospedeiras (FITT, 1989; CUNNINGHAM & ZALUCKI, 2014), incluindo culturas economicamente importantes como algodão, soja, milho e tomate (MORAL-GARCIA, 2006; SPECHT et al., 2013).

Atualmente além do controle químico, plantas geneticamente modificadas contendo o gene *cry* são utilizadas para o controle de *H. armigera*. Porém este inseto exibe capacidade de adaptação e desenvolvimento de resistência para ambas alternativas (AGGARWAL et al., 2006; DOWNES & MAHON, 2012). A polifagia e capacidade de adaptação tornam esta praga extremamente agressiva e passível da produção de grandes prejuízos. No Brasil, *H. armigera* era considerada praga quarentenária até o início de 2013 quando foi constatada no país (CZEPAK et al., 2013). A confirmação oficial da presença da praga no Rio Grande do Sul também ocorreu em 2013 (SALVADORI et al., 2013; SALVADORI et al., 2014)

Portanto, é necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para o controle desta e de outros insetos-praga, visando a redução no uso de inseticidas químicos e o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável e com maior preocupação na preservação do meio ambiente.

Nesse sentido, a utilização do mecanismo de RNAi surge como uma alternativa para o controle de *H. armigera* e outros insetos-praga. O silenciamento de genes vitais ao inseto resultando na redução da proteína alvo e causando,

consequentemente, mortalidade e alterações no desenvolvimento do inseto-praga alvo é uma nova tecnologia que tem sido estudada por diversos grupos de pesquisa tendo diferentes insetos como alvo do silenciamento mediado por RNAi (revisado por HUVENNE & SMAGGHE, 2010; TERENIUS et al. 2011; LIM et al., 2016).

Essa tecnologia pode ser ampliada pela possibilidade de utilização de diversos genes com capacidade de afetar o desenvolvimento dos insetos alvo. Além disso, pode ser adaptada para diferentes insetos pela alteração da sequência do RNAdf para que seja específico ao inseto alvo, evitando o efeito *off-target*, ou seja, que não afete insetos não alvo (BURAND & HUNTER, 2013; GU & KNIPPLE, 2013; SCOTT et al., 2013).

Inicialmente, a possibilidade de utilizar o mecanismo de silenciamento gênico por RNAi como uma alternativa de controle de insetos-praga, não era visto como um método viável (PRICE & GATEHOUSE, 2008), devido as dificuldades encontradas, como degradação do RNAdf no intestino do inseto, ausência de homólogos dos genes de amplificação do silenciamento, necessidade de alimentação contínua e em grandes concentrações de RNAdf para obtenção de resultados positivos (PRICE & GATEHOUSE, 2008; TERENIUS et al., 2011). Porém, recentes estudos têm demonstrado que essas percepções eram muito pessimistas e que é possível a obtenção de produtos biotecnológicos que utilizem o mecanismo de RNAi como método de controle de insetos-praga (BAUM et al, 2007), incluindo a produção de plantas transgênicas expressando RNAdf para controle de *H. armigera*

(MAO et al., 2007; MAO et al., 2011; SHABAB et al., 2014; LIU et al., 2015; MAMTA et al., 2016).

O método de disponibilização do RNAdf aos insetos pode interferir na eficiência do silenciamento (TERENIUS et al., 2011; YANG et al., 2011; SCOTT et al., 2013; YU et al., 2013). A microinjeção de RNAdf no inseto, minimiza as dificuldades da absorção do RNAdf pelas células, sendo um dos métodos mais utilizados para análise de expressão gênica. Porém, considerando a possibilidade do desenvolvimento de uma nova tecnologia para controle de insetos-praga através do silenciamento de genes alvo específicos, a alimentação com RNAdf é um método atrativo (PRICE & GATEHOUSE, 2008; TERENIUS et al., 2011; BURAND & HUNTER, 2013).

Insetos da ordem Lepidoptera, especialmente, apresentam alguns aspectos recalcitrantes em relação à susceptibilidade ao RNAi quando as moléculas são disponibilizadas via oral (TERENIUS et al., 2011; LIM et al., 2016). Estes aspectos são relacionados principalmente à presença de enzimas no sistema digestório do inseto que degradam o RNAdf. A ausência, nos insetos, da enzima RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA Polymerase – RdRp*), envolvida na resposta sistêmica de RNAi também interfere na efetividade do silenciamento mediado por RNAi (JOSE & HUNTER, 2007).

A escolha do gene-alvo também é essencial para que se obtenha bons resultados. Alguns critérios devem ser levados em consideração para a escolha do gene. Destaca-se: (i) a função do gene, que deve exercer função essencial para a sobrevivência

do inseto; (ii) o local de expressão, tratando-se de disponibilização do RNAdf via oral, genes expressos no intestino do inseto podem apresentar melhores resultados, uma vez que, as células intestinais são as primeiras a entrar em contato com o RNAdf administrado via oral (TERENIOUS et al., 2011); (iii) “*half-time*” da proteína codificada pelo gene silenciado, porém as informações sobre o tempo de vida das proteínas é muito escasso (SCOTT et al., 2013) e, (iv) abundância de transcritos na célula e existência de mecanismo de feedback resultando em supressão do silenciamento ou super expressão do gene alvo (LIM et al., 2016).

O gene *rieske* codifica a proteína Iron-sulfur, componente do Citocromo bc1 da membrana mitocondrial, também conhecido como Ubiquinol-citocromo-c Redutase ou Complexo III. O Complexo III é o principal responsável pela cadeia de transferência de elétrons da mitocôndria, e produção de energia (GONG et al., 2011). O silenciamento desse gene irá interferir na produção de energia e têm potencial de causar efeitos deletérios no inseto-alvo. Gong et al. (2011) verificaram a efetividade do silenciamento e os efeitos deletérios resultante da baixa expressão desse gene em *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). Para *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae), psílideo vetor das bactérias que causam o *Grenning*, umas das principais doenças que afetam a citricultura, também foi verificado a ocorrência do silenciamento do gene *rieske* e a efetividade na obtenção de efeitos deletérios no inseto alvo (RAMOS et al., 2014).



O objetivo do trabalho foi verificar se o RNAdf do gene *rieske* apresenta potencial para controle de *H. armigera*, determinar qual a dose de RNAdf *rieske* disponibilizado via oral às larvas neonatas causa mortalidade e efeitos subletais, e, verificar a ocorrência da redução da expressão do gene *rieske* nas larvas de *H. armigera* mediado pelo mecanismo de RNAi.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho consistiu de dois experimentos. Um experimento piloto para determinação da dose de RNAdf do gene *rieske* (RNAdf *rieske*) que causa maior taxa de mortalidade e interfere no desenvolvimento dos insetos e, um experimento utilizando somente a melhor dose. No experimento II além da avaliação de mortalidade e efeitos deletérios no desenvolvimento do inseto, foi avaliado o silenciamento gênico induzido pela alimentação com RNAdf *rieske*. Os aspectos metodológicos comuns aos dois experimentos são descritos a seguir.

### 2.1 Insetos

O trabalho foi realizado com larvas neonatas de *H. armigera* que foram obtidas do Laboratório de Entomologia da Universidade de Passo Fundo. As larvas foram obtidas de uma criação em dieta artificial modificada de Greene et al. (1976). As condições de crescimento para criação dos insetos foram controladas, com fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 25 °C  $\pm$  2 °C e umidade de 70%  $\pm$  10%. Após a formação das pupas,

estas foram sexadas e, aproximadamente, 15 fêmeas e 15 machos, foram colocadas em gaiolas de tubo de PVC cobertas com tule para oviposição. Os adultos foram alimentados com solução de mel 10%.

Nos experimentos, as larvas neonatas de *H. armigera* foram individualizadas em placas de Petri de 5 cm de diâmetro com discos de papel filtro umedecidos com 200 µl de água ultrapura (Milli-Q) a cada dois dias para manter a umidade do ambiente. Foram mantidas em ambiente controlado com fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 25 °C ± 1 °C e umidade de 70% ± 10%.

## **2.2 Produção do RNAdf *rieske* e RNAdf de molécula teste (RNAdf-T)**

A produção do RNA dupla fita do gene *rieske* foi realizada no Horticultural Research Laboratory Laboratory, ARS-USDA, Fort Peirce-FI pela Dra. Magali F. Grando, conforme descrito a seguir.

A sequência de nucleotídeos do cDNA do gene *rieske* de *H. armigera* foi obtida do GenBank-NCBI (acesso: K145425.1), utilizando a ferramenta tBLASTX EST Database com a sequência do gene *rieske* de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (acesso: JN992290.1). Os *primers* *Forward*: GGTGGTTTCTAATGGCCTGA e *Reverse*: GAAGTGCGTCACCAAGGACT foram desenhados utilizando o software PRIME 3 e utilizados para produção do cDNA a

partir do RNA extraído de *H. armigera* coletada a campo em Passo Fundo no final de 2013.

A extração do RNA do sistema digestório das larvas foi realizada com o *kit* RNeasy (Quiagen, EUA), conforme instruções do fabricante. O cDNA foi produzido utilizando o *kit* OneStep RT-PCR (Quiagen, EUA), de acordo com a indicação do fabricante, utilizando como molde 100 ng de RNA do inseto em uma reação de 25 µl. Foi utilizado o termociclador T-100 (BioRad, EUA) nas seguintes condições: 50 °C por 30 min (reação da transcriptase reversa), 95 °C por 15 min, seguida por 36 ciclos de 94 °C por 1 min (desnaturação), 65 °C por 1 min (anelamento dos *primers*) e 72 °C por 1 min (alongamento), sendo a extensão final de 72 °C por 10 min.

O produto da amplificação de 343 bp  
GGTGGTTTCTAATGGCCTGAAGCCTCTGGTTGTCGCGC  
ATACACCAGCTGAAAAGGTGTTGGTGCACCCCTTGCCA  
AAAACCTCGACTGTGGAGTCACTGCATGGATCCCTGCC  
TATCCAAGGCTTGAAGGCCAGAGTAAACGGTCGCGGG  
CCAAGCCATGTACGTTTTCGCGCATACCGACATCAGCTA  
CCCCGACTTCTCGGCGTACCGTCGCAAGGAGACGCAG  
GATCCCACCTCAAGGGCTAACGACAATGTCGGTGGAC  
GTCAGTCCTTCACTTATCTTATCGCTGGAGCCGGTGGT  
GTGGCCGGTGCGTACGCCGCAAGTCCTTGGTGACGC  
ACTTC foi analisado em gel de agarose 1%. O produto do PCR  
foi ligado em plasmídeo bacteriano e inserido na *Escherichia coli* (Escherich) (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae) para clonagem utilizando o Topo Cloning *Kit/Top10 E. coli* (Invitrogen, EUA). O plasmídeo foi isolado de bactérias

transformadas crescidas *overnight* em meio LB contendo canamicina com o Wizard Plus SV Miniprep (Promega, EUA), sendo o mesmo sequenciado para confirmação da presença do gene *rieske*.

Para produção do molde para a posterior síntese do RNAdf, o cDNA clonado foi amplificado com *primers* contendo o promotor T7 no terminal 5'(TAATACGACTCACTATAGGG) em reação de PCR de 50 µl com o *Kit* Platinum PCR Super Mix (Invitrogen, EUA), conforme as recomendações do fabricante, nas seguintes condições: 95 °C por 1 min, seguida por trinta ciclos de 94 °C por 20 s, (desnaturação), 56 °C por 20 s (anelamento dos *primers*) e 72 °C por 1 min (alongamento), sendo a extensão final de 72 °C por 10 min. O produto do PCR foi analisado em gel de agarose 1% e a banda de tamanho esperado foi extraída do gel e purificada com o Wizard SV Gel and PCR clean-up system *Kit* (Promega, EUA). A síntese *in vitro* do RNAdf foi realizada com *kit* MEGAscript® T7 (Life Technologies, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do RNAdf foi determinada na absorbância de 260 e 280nm empregando o nanoespectrofotômetro NanoDrop™8000 (Thermo Scientific, EUA) e sua integridade analisado em gel de eletroforese a 1%.

Para controle do experimento foi utilizado moléculas de RNAdf de um gene não alvo, ou seja, não presente em insetos. Esta molécula-teste, denominada RNAdf-T foi sintetizada *in vitro* pelo *kit* MEGAscript® T7 (Life Technologies, EUA) e possui 480pb.

O RNAdf foi diluído em água livre de nucleases com 0,01% de surfactante Silwet® para que a solução de RNAdf se espalhasse uniformemente sobre disco foliar. As diluições foram de 0,003, 0,03 e 0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Em cada disco foliar de soja de 1  $\text{cm}^2$  foi colocado 10  $\mu\text{l}$  das soluções, totalizando 0,03, 0,3 e 3,0  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  da solução de RNAdf, respectivamente. Estas diluições foram utilizadas para o experimento I. Para o experimento II foi utilizada somente a diluição de 0,03  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , que aplicado 10  $\mu\text{l}$  da solução por  $\text{cm}^2$  totalizou 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

### 2.3 Experimento I

Foram testadas três doses de RNAdf *rieske*, 0,03, 0,3 e 3,0  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  e como controle foi utilizada água livre de nucleases. O RNAdf *rieske* foi disponibilizado aos insetos nos dias 0, 2 e 4 na superfície do disco foliar de soja de 0,5  $\text{cm}^2$  no dia 0 e 1  $\text{cm}^2$  nos dias 2 e 4 (Figura 1). Após este período foram disponibilizados discos foliares não tratados com RNAdf *rieske* para manter o cultivo dos insetos até o décimo sétimo dia de experimento.

O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e dez repetições, sendo cada repetição composta de uma lagarta individualizada em uma placa de Petri. Diariamente, ao longo de dezessete dias, foram avaliados mortalidade, consumo e desenvolvimento dos insetos. A troca dos estádios de desenvolvimento foi avaliada pela coleta da cápsula cefálica, indicando que os insetos realizaram a ecdise. A cada três dias, a partir do sexto dia, foi realizada a avaliação do

peso das lagartas. As larvas mortas nos quatro primeiros dias de experimento foram excluídas da análise para evitar a interferência de dados de mortalidade resultantes de estresse inicial por manipulação.

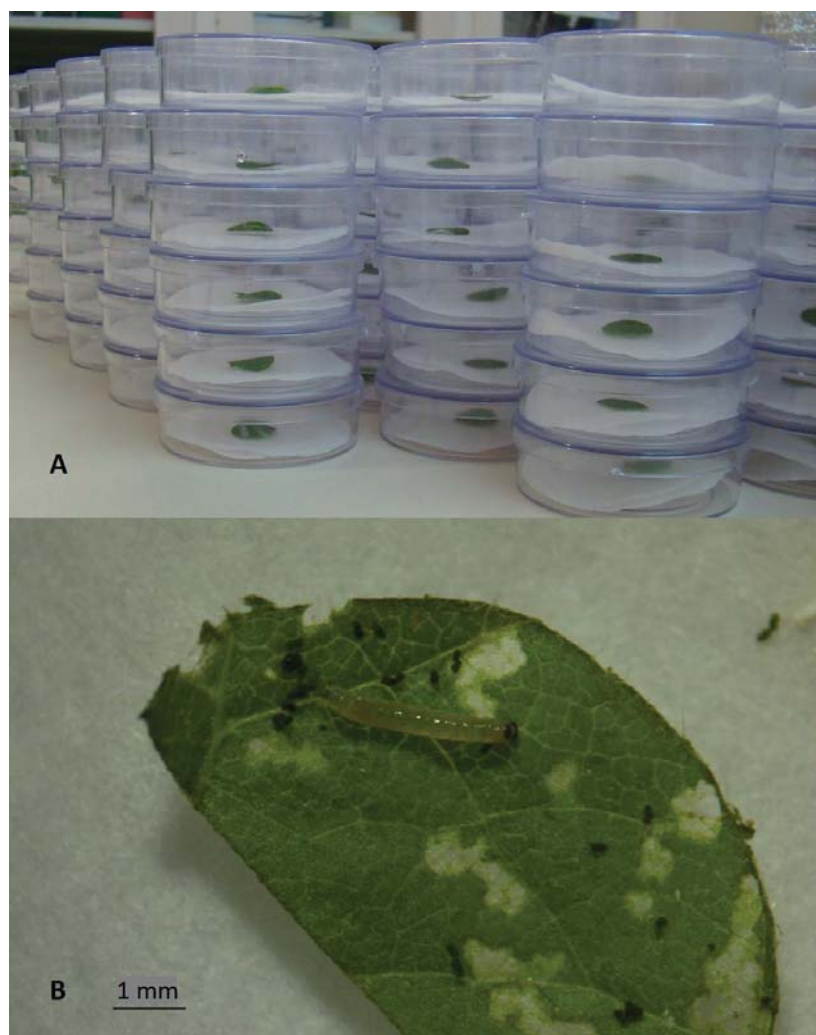


Figura 1 – Metodologia de alimentação das larvas de *Heliocverpa armigera*. A) as larvas foram mantidas individualizadas em placas de Petri de 5 cm de diâmetro com papel filtro umedecido. B) o RNAdf foi disponibilizado as larvas sobre discos foliares de soja. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.

A análise estatística foi realizada no software CoStat® 6.400. Foi utilizada a análise descritiva utilizando os resultados de média, desvio padrão e coeficiente de variação para comparação entre os tratamentos e avaliação da melhor dose para controle de *H. armigera*. A mortalidade corrigida foi calculada pela fórmula de Abbott (1925):

$$\% \text{ mortalidade corrigida: } \frac{\text{n}^\circ \text{ de vivos do controle} - \text{n}^\circ \text{ de vivos do tratado}}{\text{n}^\circ \text{ de vivos do controle}} \times 100$$

Para confirmação dos dados obtidos nesse experimento foi testada novamente a dose de 0,3 µg.cm<sup>-2</sup>, que apresentou o melhor resultado. Como controle foi utilizada água livre de nucleases. O RNAdf *rieske* foi disponibilizado aos insetos nos dias 0, 2, 4 e 6 sobre discos foliares de soja de 1cm<sup>2</sup>, totalizando uma disponibilização de 1,2 µg de RNAdf por lagarta. Após este período foram disponibilizados discos foliares não tratados com RNAdf *rieske* para manter o cultivo dos insetos até o décimo dia. As avaliações ocorreram somente até este dia devido a um erro metodológico que causou estresse ambiental levando as larvas à mortalidade. Para evitar erros de interpretação dos resultados devido ao estresse, os dados foram considerados confiáveis e avaliados somente até o décimo dia do experimento.

O delineamento foi inteiramente casualizado com dois tratamentos e trinta repetições, sendo cada repetição composta de uma lagarta. A mortalidade das larvas foi avaliada diariamente para confirmação dos dados obtidos anteriormente.

Os dados foram submetidos a análise descritiva utilizando os resultados de média, desvio padrão e coeficiente de variação.

## 2.4 Experimento II

Visando o estudo da mortalidade, desenvolvimento dos insetos e sua relação com o silenciamento gênico causado pelo RNAdf *rieske*, foi realizado um experimento de maior magnitude onde as larvas de *H. armigera* foram alimentadas com o RNAdf *rieske* e o RNAdf-T e água livre de nucleases (como controles negativos). O RNAdf -T foi utilizado na mesma dose e condições de alimentação do RNAdf *rieske*, como controle para confirmar que o efeito é causado somente pelo RNAdf específico do gene alvo.

Os RNAsdf foram disponibilizados às larvas em discos foliares de soja nos dias nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 na concentração de 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . No dia 0 foi disponibilizado discos foliares com 0,5  $\text{cm}^2$ , entre os dias 2 à 10 foram disponibilizados discos foliares de soja de 1 $\text{cm}^2$  contendo os RNAdfs, no dia 12 foi disponibilizado um disco foliar de soja de 4  $\text{cm}^2$ , na mesma concentração de 0, 3  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . No total, foram disponibilizados 2,85  $\mu\text{g}$  de RNAdf aos insetos durante o desenvolvimento larval.

Diariamente, foram avaliados mortalidade, desenvolvimento, peso e consumo. Quando as larvas atingiram o 3º e o 6º estágio de desenvolvimento, no 5º e 13º dia de experimento, respectivamente, foi realizada a coleta de amostras de insetos para extração do RNA a ser utilizado no RT-qPCR para verificação do nível de expressão do gene *rieske*.



O delineamento foi inteiramente casualizado com 12 repetições, sendo cada uma composta por 10 larvas. As larvas mortas no 1º estágio de desenvolvimento, devido a estresse de manipulação, e as larvas coletadas para extração de RNA foram retiradas das análises. Para a análise estatística de mortalidade as repetições foram reorganizadas, de forma que, cada repetição fosse composta por dez larvas. Para a análise de peso e consumo médio diário foi considerado o número de lagartas sobreviventes no dia da avaliação, sendo que cada lagarta correspondeu a uma repetição na análise estatística, para análise de consumo médio total, foram considerados o número inicial de lagartas e o consumo durante os 12 dias de dieta em discos foliares.

Após o 13º dia, as larvas foram colocadas em dieta adaptada de Greene et al. (1976) para suprir a necessidade nutricional exigida para que os insetos chegassem a fase de pupa.

Para análise estatística foi utilizada a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro, utilizando o software CoStat® 6.400.

## **2.5 Coleta dos insetos para extração do RNA**

Baseado em estudos anteriores, as larvas em 3º e 6º estágio de desenvolvimento apresentam maior expressão do gene *rieske*. Dessa forma, quando as larvas atingiram o 3º e 6º instar foi realizada a coleta das amostras para dissecação do sistema digestório e posterior extração de RNA do tecido digestório e tecidos do restante do corpo. Foram coletadas larvas

para cinco replicatas biológicas do tratamento e dos controles, sendo cada uma composta por duas lagartas. Foram utilizadas somente larvas vivas para extração do RNA.

## **2.6 Extração de RNA e síntese de cDNA**

O RNA para estudo da expressão gênica foi extraído utilizando Trizol (Sigma-Aldrich, EUA), seguindo protocolo de Chomczynski & Mackey (1995). Para quantificação e determinação da pureza das amostras foi utilizado nanoespectrofotômetro NanoDrop™2000 (Thermo Scientific, EUA), sendo as amostras mensuradas na absorbância de  $A_{260}$  e  $A_{280}$ . Foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da integridade do RNA extraído. Para eliminação da contaminação com DNA genômico, as amostras foram tratadas com RQ1 RNase Free DNase (Promega, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada utilizando *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems, EUA). Para cada amostra, 1  $\mu$ g de RNA foi utilizado para cada 20  $\mu$ l de reação. A composição e termociclagem da reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

## **2.7 RT-qPCR**

*Reverse Transcription Quantitative Real Time-PCR* (RT-qPCR), ou seja, a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real, foi empregado para o

estudo da expressão do gene *rieske*, alvo do silenciamento, em larvas tratadas oralmente com o RNAdf *rieske*, RNAdf-T e água livre de nucleases como controle negativo.

O RT-qPCR foi realizado utilizando o *Kit* Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reação de 20 µl utilizou-se 0,5 µl de cada um dos *primers* (Tabela 1) na concentração de 10µM e 2 µl de cDNA na concentração de 10 ng/µl. Os *primers* do gene *rieske* foram desenhados fora da região do RNAdf *rieske*, a fim de evitar a amplificação de fragmentos do próprio RNAdf. Os ciclos de amplificação foram de 95 °C por 20 s, 40 ciclos de 95 °C por 3 s e 60 °C por 30 s, utilizando equipamento Step One Plus (Thermo Fischer Scientific, EUA). Para análise da pureza dos produtos do RT-PCR foi realizada a análise da curva de dissociação (curva de *Melting*) de 65 °C à 95 °C. Foram coletadas cinco replicatas biológicas para cada tratamento. A amplificação foi realizada em triplicatas técnicas.

Tabela 1 - Pares de *primers* dos genes de referência e gene *rieske* utilizados para RT-qPCR. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Número de acesso	Amplicom (pb)	Eficiência <sup>a</sup>
<b><i>Efl-α</i></b>	F:CTGATTGTGGGCGTCAACAA R:TCGACGTCCATCCCCTTGAA	U20129.1	209	1,83
<b><i>GAPDH</i></b>	F:AGGGTGGTGCTAAGAAGGTC R:CCATCCACTGTCTTCTGGGT	JF417983.1	232	1,83
<b><i>Rieske</i><sup>b</sup></b>	F:GGCTGGGTATTTGGCTCCTT R:AGCTGCCATGGACGACAC	JN992290.1	400	1,85

<sup>a</sup>: eficiência de amplificação dos *primers* calculada pelo programa LinReg dados relativos a 10 ng de molde e 10µM *primers* na reação.

<sup>b</sup>: *primers* desenhados fora da área da sequência do RNAdf *rieske*.

A análise da expressão do gene foi realizada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK & SCHITTEGEN, 2001) utilizando os genes de referência *ef1- $\alpha$*  e *GAPDH*, validados nas condições experimentais específicas, para normalização dos dados obtidos do RT-qPCR. Para análise estatística foi utilizado o teste T.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Experimento I

Foi avaliada a resposta das larvas de *H. armigera* alimentadas com três doses do RNAdf *rieske*, fornecidas três vezes (dias 0, 2 e 4), quanto a mortalidade, peso e consumo foliar em soja, ao longo de 17 dias.

##### 3.1.1 Mortalidade das larvas alimentadas com diferentes doses de RNAdf *rieske*

A dose de  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de RNAdf *rieske* induziu maior mortalidade total (75,0%) quando comparada ao controle (água) (33,3%) e às doses  $3,0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  e  $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  RNAdf *rieske*, que causaram a mortalidade de 25,0% e 50,0% das lagartas, respectivamente (Figura 2). A mortalidade corrigida observada com a dose  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  RNAdf *rieske* foi de 62,0% (Tabela 2).

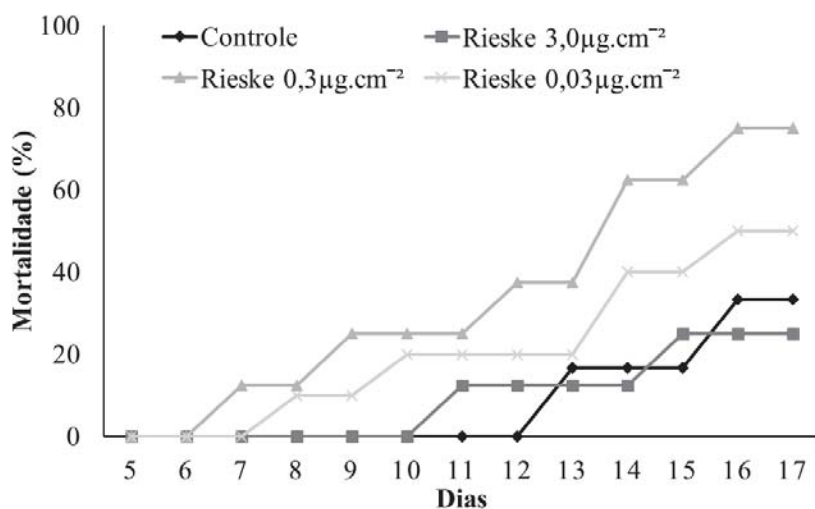


Figura 2 – Dinâmica da mortalidade de *Helicoverpa armigera* alimentada com diferentes doses de RNAdf *rieske* entre o 5º e o 17º dia de experimento. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.

Tabela 2 - Mortalidade e mortalidade corrigida de *Helicoverpa armigera* alimentadas com três doses de RNAdf do gene *rieske*. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS

Tratamento	Mortalidade (%)	Mortalidade corrigida** (%)
Controle (água)	33,3	
RNAdf <i>rieske</i> 3,0 µg.cm <sup>-2</sup>	25	11,0
RNAdf <i>rieske</i> 0,3 µg.cm <sup>-2</sup>	75	62,0
RNAdf <i>rieske</i> 0,03 µg.cm <sup>-2</sup>	50	25,0

\* Fórmula de Abbott (1925).

Os resultados sugerem que a alimentação com RNAdf do gene *rieske* causou a morte de larvas de *H. armigera*. Possivelmente, a mortalidade foi causada pela redução da expressão do gene *rieske* levando à inibição do transporte de elétrons pela mitocôndria. Em *H. armigera*, é a primeira vez que

o gene *rieske* é testado como potencial alvo de silenciamento para controle deste inseto-praga. Um fato interessante nos resultados obtidos foi que a dose intermediária foi mais efetiva que a dose mais alta do RNAdf *rieske* utilizada.

Apesar da menor susceptibilidade dos insetos da ordem Lepidoptera ao RNAi, experimentos utilizando RNAdf ou siRNA de determinados genes alvos, especialmente expressos no sistema digestório e disponibilizados via oral, tem causado efeitos letais e subletais (MAO et al, 2007; KUMAR et al., 2009; GONG et al., 2011; MAO et al., 2011; ASOKAN et al., 2014; MAO et al., 2015). Para *H. armigera*, geralmente, são necessárias altas doses de RNAdf (>1 µg) para que ocorra o silenciamento do gene alvo e os efeitos fenotípicos sejam visíveis (LIM et al., 2016). Considerando os principais trabalhos publicados com RNAi em lepidópteros, a dose de RNAdf disponibilizada aos insetos é diretamente proporcional com a resposta ao silenciamento, mortalidade e efeitos deletérios (TERENIUS et al., 2011).

Os resultados demonstraram que a maior dose utilizada (3,0 µg.cm<sup>-2</sup> de RNAdf *rieske*) não foi efetiva para mortalidade e efeitos subletais em *H. armigera*. Uma possível justificativa para isso é a possível saturação de RNAdf na célula, que impediu o funcionamento normal do mecanismo de processamento do RNAdf e silenciamento do gene alvo, não resultando na morte das lagartas.

Há, também, a possibilidade de existência de mecanismos de *feedback* de regulação. Quando são aplicadas altas doses de RNAdf, levando a elevadas taxas de

silenciamento do gene alvo e esgotando os níveis do RNAm, pode ocorrer a supressão do silenciamento ou super expressão do gene alvo do silenciamento (LIM et al., 2016). Porém, Asokan et al. (2013) observaram super expressão do gene *JHAMT* quando utilizou altas doses de RNAdf, 40, 60 e 80 µg de diluídos em 40 µl de água e aplicado sobre a superfície da dieta semi-artificial. As doses que causaram super expressão foram muito elevadas comparadas à que foi utilizada no presente trabalho, 3,0 µg.cm<sup>-2</sup> de RNAdf *rieske*, disponibilizado em três alimentações, totalizando 9 µg.cm<sup>-2</sup> de RNAdf *rieske*.

Apesar de, geralmente, a taxa de silenciamento e mortalidade ser diretamente proporcional à dose de RNAdf aplicada aos insetos, ocorre grande variação nos experimentos com RNAi, especialmente quando se trabalha com insetos da ordem Lepidoptera, indicando diferentes graus de susceptibilidade/resistência ao RNAi nesta ordem (TERENIUS et al., 2011).

Em experimentos semelhantes foi observado diferenças nos resultados obtidos. Gong et al. (2011), utilizando 3,0 µg.cm<sup>-2</sup> de siRNA do gene *rieske*, obteve 73% de mortalidade e aproximadamente 90% de redução da expressão do gene alvo nas larvas de *P. xylostella* após 6 horas da alimentação com RNAdf. Já, para *H. armigera*, no presente trabalho, utilizando RNAdf do mesmo gene na mesma dosagem, os resultados não foram semelhantes.

### 3.1.2 Ganho de peso das larvas alimentadas com diferentes doses de RNAdf *rieske*

As larvas alimentadas com a dose de  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  RNAdf *rieske* foram as que apresentaram menor ganho de peso contabilizado ao longo do 6<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup>, 12<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias (Figura 3). O ganho de peso, entre o 6<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia, das lagartas alimentadas com  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  foi de 22,5 mg. No controle e nas doses de 3,0 e  $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , o ganho de peso das larvas foi de 86,7, 69,3 e 52,0 mg, respectivamente.

A alimentação das larvas com a dose de  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de RNAdf causou 74% de redução do ganho de peso em relação ao controle, enquanto a dose de  $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  induziu 40,5% e a dose de  $3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  causou 21,5% de redução do ganho de peso.

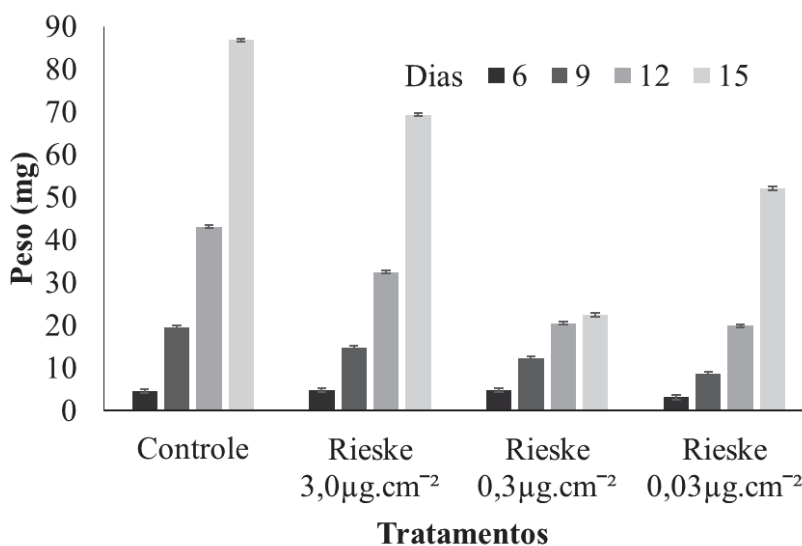


Figura 3 - Peso médio das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com diferentes doses de RNAdf *rieske*. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Nas barras está representado o desvio padrão.



### 3.1.3 Consumo das larvas alimentadas com diferentes doses de RNAdf *rieske*

Além de provocar morte e afetar o ganho de peso, os tratamentos com RNAdf também reduziram o consumo do alimento fornecido. O consumo médio final de área foliar foi menor nas larvas alimentadas com  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de RNAdf *rieske* ( $9,7 \text{ cm}^2$ ) quando comparadas ao controle ( $33,4 \text{ cm}^2$ ), o que representa uma redução de 71,0% no consumo de área foliar pelas lagartas tratadas (Figura 4). As doses de  $3,0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  e  $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  apresentaram redução de 27,5% e 44,6% no consumo em relação ao controle, respectivamente.

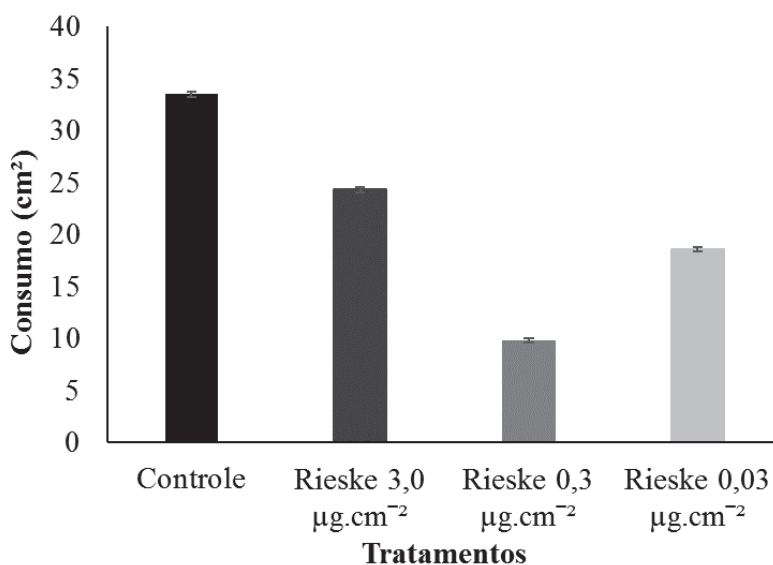


Figura 4 – Consumo médio total de *Helicoverpa armigera* alimentadas com diferentes doses de RNAdf *rieske*. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Nas barras está representado o desvio padrão.

A redução de 71% de consumo por um inseto-praga agressivo como a *H. armigera*, que se alimenta de cultivos agrícolas importantes para a economia do país, principalmente algodão e soja, se mostra como um dado bastante promissor na busca de novas alternativas de controle deste inseto.

A redução do consumo se deve, em parte pela mortalidade das larvas causada pela alimentação com o RNAdf *rieske*, e em parte pela menor capacidade de consumo das lagartas sobreviventes devido ao atraso no desenvolvimento das mesmas.

O consumo nos dias 0, 2 e 4 foi calculado pelo software Zen<sup>®</sup> que permite a delimitação da área consumida em cm<sup>2</sup>. A Figura 5 mostra aspectos do disco foliar consumido por larvas de *H. armigera* do controle. A partir do 6<sup>o</sup> dia foi realizada avaliação visual do percentual do disco foliar consumido, seguido da transformação para cm<sup>2</sup> para análise.



Figura 5 – Disco foliar de soja consumido pelas larvas de *Helioverpa armigera* aos 4 dias de experimento. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.

### 3.1.4 Desenvolvimento das larvas alimentadas com diferentes doses de RNAdf *rieske*

O fornecimento de  $0,3 \mu\text{g.cm}^{-2}$  de RNAdf *Rieske* levou a um atraso no desenvolvimento larval de forma que no 15º dia do experimento, 40% das larvas ainda se encontravam no 4º ínstar, enquanto que todas as lagartas do controle já tinham atingido o 6º instar (Tabela 3).

Tabela 3 – Percentual de larvas de *Helicoverpa armigera* no 4º, 5º e 6º estágio de desenvolvimento aos 15 dias de experimento com fornecimento oral de RNAdf *rieske* em diferentes doses. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS

Tratamentos	Ínstar		
	4º	5º	6º
Controle (água)	0	0	100
RNAdf <i>rieske</i> $3,0 \mu\text{g.cm}^{-2}$	0	0	100
RNAdf <i>rieske</i> $0,3 \mu\text{g.cm}^{-2}$	40	0	60
RNAdf <i>rieske</i> $0,03 \mu\text{g.cm}^{-2}$	0	20	80

A redução no peso e no consumo das larvas de *H. armigera* alimentadas com RNAdf tem sido demonstrada em diversos experimentos e é um dos efeitos subletais resultantes do silenciamento mediado por RNAi (ASOKAN et al., 2014; MAMTA et al., 2016; MAO et al., 2007; MAO et al., 2011, MAO et al., 2015; KUMAR et al., 2009). Em estudos realizados por Mao et al. (2007), foi observado apenas 60% de aumento de peso nas larvas de *H. armigera* tratadas com RNAdf do gene *CYPAE14* em relação ao controle. Mao et al. (2015) observaram

menor consumo nas larvas alimentadas com siRNA dos genes *Coatomer  $\beta$*  e *V-ATPase A* em relação as larvas alimentadas com siRNA do gene *EGFP*, não relacionado à genes encontrados no inseto.

O silenciamento do gene-alvo pode causar alterações na morfologia e fisiologia do sistema digestório do inseto (MAO et al., 2015) resultando dessa forma, na redução do consumo, peso e, conseqüentemente, redução do tamanho das larvas. Aos 15 dias de experimento, as larvas alimentadas com  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  RNAdf *rieske* apresentaram diferenças significativas no tamanho das lagartas (Figura 6). A ocorrência destes efeitos no desenvolvimento do inseto é de extrema importância, uma vez que reduz os danos causados na lavoura.

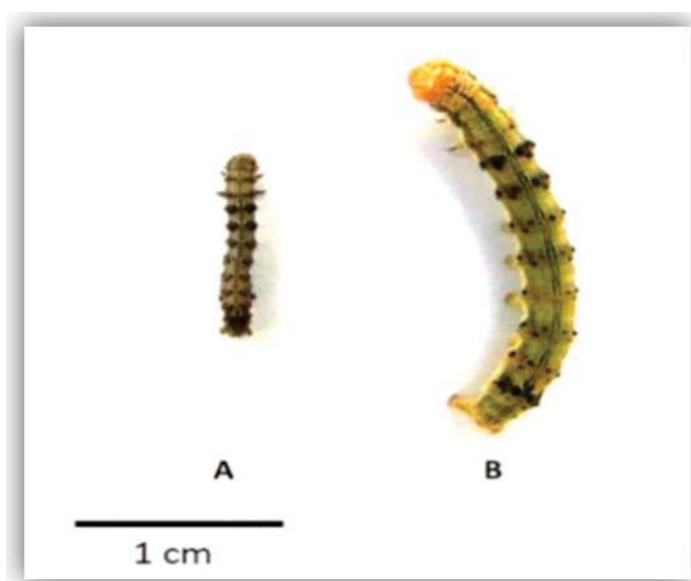


Figura 6 - Redução do desenvolvimento de larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  RNAdf *rieske* (A) e controle (B) no 15º dia de experimento. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS.

A dose de  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  RNAdf *rieske* foi efetiva na indução de mortalidade e efeitos subletais no desenvolvimento dos insetos. Apresentando 41,7% de mortalidade em relação ao controle, 74% de redução do ganho de peso em relação ao controle e o consumo foi 71% menor em relação ao controle.

### **3.1.5 Validação do efeito da dose de $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de RNAdf *rieske* na mortalidade das larvas**

Para validação dos resultados obtidos no experimento I foi realizado um experimento adicional com a melhor dose de RNAdf *rieske*,  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , e com maior número de larvas por tratamento. Foi avaliado a taxa de mortalidade dos insetos tratados com RNAdf *rieske* e controle até o décimo dia de experimento, quando ocorreu um estresse de alta umidade no ambiente em que as larvas estavam. Dessa forma, para evitar erros na interpretação dos resultados, foram considerados somente os dados obtidos até o décimo dia.

A mortalidade total das larvas alimentadas com RNAdf *rieske* aos dez dias de experimento foi de 16,6%, cinco vezes maior em relação ao controle (3,3%). Comparado à taxa de mortalidade total das alimentadas com  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de RNAdf *rieske* no experimento anterior (41,7% em relação ao controle) observado no 17º dia do experimento, os dados não são correspondentes. Porém, considerando a taxa de mortalidade observada em ambos os experimentos no 10º dia, os resultados são semelhantes (Figura 7). A diferença na taxa de mortalidade entre os dois experimentos pode ser explicada pelo pequeno

número de repetições no primeiro experimento (n=10), de forma que, cada lagarta morta significasse uma elevação expressiva na taxa de mortalidade total.

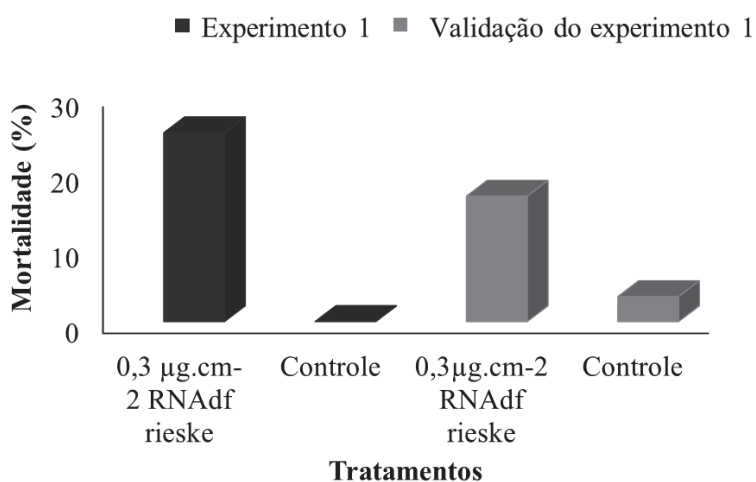


Figura 7 – Mortalidade das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com 0,3 µg.cm<sup>-2</sup> de RNAdf *rieske* aos dez dias no experimento I de teste de dose e no experimento adicional de validação da melhor dose. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS

A dose de 0,3 µg.cm<sup>-2</sup> RNAdf *Rieske* foi a que apresentou melhores resultados no controle de *H. armigera*. O RNAdf *rieske* causou mortalidade e interferiu no desenvolvimento das larvas de *H. armigera* quando estas foram alimentadas com moléculas de RNAdf *rieske*. Este gene apresenta potencial para uso como gene alvo de silenciamento mediado por RNAi.

Para confirmação dos dados de mortalidade e de que é causada pelo silenciamento do gene *rieske*, foi realizado o segundo experimento. Para o experimento II foi utilizado maior

número de larvas e a dose disponibilizada foi de  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de RNAdf *rieske*, dose que apresentou resultados que indicaram maior potencial para controle de *H. armigera* e além da análise de mortalidade e do fenótipo dos insetos também foi avaliada a expressão do gene *rieske* pelo RT-qPCR.

## 3.2 Experimento II

### 3.2.1 Mortalidade das larvas alimentadas com $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de RNAdf *rieske*

As larvas alimentadas com RNAdf *rieske* apresentaram a maior taxa de mortalidade durante todo o desenvolvimento larval. Entretanto, diferença estatisticamente significativa pode somente ser observada até o quinto dia de experimento, com 12,9% de mortalidade nas larvas alimentadas com RNAdf *rieske*, e, 0 e 3,3% de mortalidade nas larvas controle RNAdf-T e água, respectivamente. Neste período, as larvas foram alimentadas exclusivamente com discos foliares de soja contendo o RNAdf (Figura 8).

A partir do quinto dia, a alimentação das larvas foi suplementada com discos foliares não tratados para suprir a necessidade nutricionais até o 13º dia. Considerando a mortalidade aos 13 dias do experimento, quando as larvas estavam no 6º estágio de desenvolvimento, não houve diferença estatística na taxa de mortalidade entre os tratamentos (Figura 8). Da mesma forma, depois do 13º dia, as larvas foram transferidas para dieta artificial modificada de Greene et al.

(1976) (desprovida de RNAdf), visando maior suplemento nutritivo para favorecer o desenvolvimento até o estágio de pupa. Considerando todo o desenvolvimento larval, incluindo o período em que as larvas foram mantidas em dieta artificial, não houve diferença estatística na mortalidade.

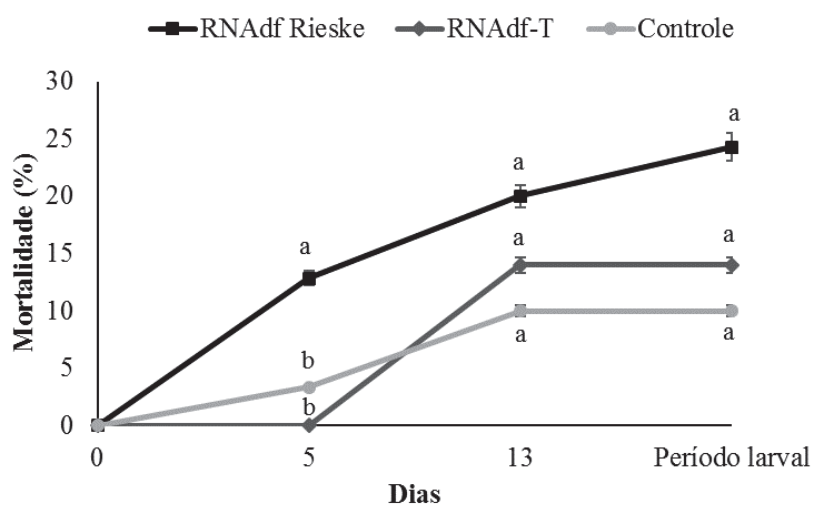


Figura 8 – Mortalidade das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com RNAdf *rieske*, e controles RNAdf-T e água ao longo do desenvolvimento larval. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. As médias diárias com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey  $P < 0,05$ . Nas barras está indicado o desvio padrão.

### 3.2.2 Avaliação da expressão do gene *rieske* via RT-qPCR em larvas alimentadas com de RNAdf *rieske*

A expressão do gene *rieske* foi avaliada em dois momentos, quando as larvas estavam no 3º e 6º estágio de desenvolvimento, dia 5 e 13, respectivamente. A análise da curva de *Melting* mostrou a presença de somente um pico de



dissociação tanto para os genes de referência quanto para o gene *rieske* indicando a presença de somente um produto de amplificação.

Os dados de expressão gênica foram compatíveis com a taxa de mortalidade observada nos dias 5 e 13. No 3º estágio de desenvolvimento, enquanto as larvas eram alimentadas somente com RNAdf e a taxa de mortalidade foi significativamente maior que os demais tratamentos, houve redução na expressão do gene *rieske* em relação às larvas alimentadas com água livre de nucleases (controle) e com RNAdf-T (Figura 9). A expressão do gene *rieske* no tecido digestório foi 31% menor que o controle. E a redução da expressão gênica no restante do corpo foi de 23%.

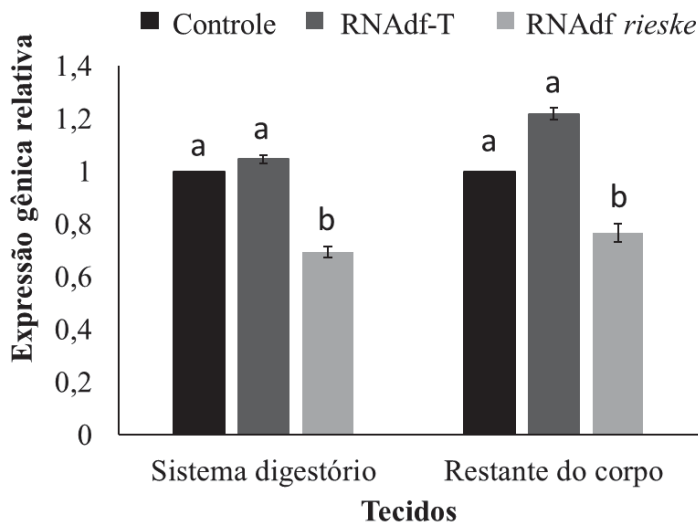


Figura 9 – Expressão do gene *rieske* nas larvas de 3º instar de *Helicoverpa armigera* alimentadas com RNAdf *rieske*, RNAdf-T e controle avaliadas por RT-qPCR. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Colunas com a mesma letra para cada grupo não diferem significativamente pelo teste T. Nas barras está indicado o erro padrão da média.

O gene *rieske* codifica para a proteína Iron-sulfur, componente do citocromo bc1, que participa da cadeia respiratória de transporte de elétrons da mitocôndria e, conseqüentemente produção de energia, o bloqueio da cadeia respiratória de transporte de elétrons tem potencial para o desenvolvimento de inseticidas (GONG et al., 2011). Os dados de mortalidade e expressão gênica, obtidos aos 5 dias de experimento, indicam que o silenciamento do gene *rieske* foi a causa da mortalidade, pela redução na produção de energia necessária para a sobrevivência dos insetos. Gong et al. (2011) verificaram, além da mortalidade e silenciamento do gene *rieske*, redução na produção de ATP nas larvas de *P. xylostella* alimentadas com siRNA do gene *rieske*.

Com 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de RNAdf *rieske* disponibilizado nos dias 0, 2 e 4, foi obtido 31% de silenciamento e 13% de mortalidade no 5º dia de experimento. Considerando que lepidópteros são menos sensíveis ao RNAi, especialmente quando o RNAdf/siRNA é disponibilizado via oral, sendo necessária alimentação contínua e em altas doses (SCOTT et al., 2013). Assim, a alimentação somente com discos foliares tratados com RNAdf ou o aumento da dose poderia ter ocasionado melhores resultados de silenciamento e mortalidade durante todo o desenvolvimento larval.

Quanto aos tecidos avaliados, foi observado que a administração oral do RNAdf *rieske* causou redução da expressão do gene *rieske* não somente nas células intestinais, que são as primeiras células a entrar em contato com o RNAdf, mas também nas células do restante do corpo, excluído o

sistema digestório (Figura 9). Esse fato nos permite afirmar a ocorrência de mecanismo de RNAi sistêmico.

A presença de um mecanismo de RNAi sistêmico em lepidópteros, incluindo *H. armigera* foi relatada por ASOKAN et al. (2014), KUMAR et al. (2009) e MAMTA et al. (2016), devido ao sucesso no silenciamento de genes não relacionados ao sistema digestório que causaram mortalidade e efeitos subletais nesses organismos. O mecanismo sistêmico faz com que o sinal do RNAi se espalhe por todo o sistema biológico passando de célula a célula (FIRE et al., 1998). Zhang et al. (2015) verificou o movimento sistêmico de RNAdf, alimentando larvas de *H. armigera* com RNAdf controle marcado com 5-Carboxifluoresceína e observou que o sinal fluorescente progressivamente amplificou-se para todo o corpo da larva, excluindo os túbulos de Malpighi. Interessantemente, o mecanismo sistêmico de RNAi ocorre mesmo não tendo sido encontrado, em insetos, a enzima RdRP (JOSE & HUNTER, 2007; PRICE & GATERHOUSE, 2008; TOMOYASU et al., 2008) a qual é responsável pela amplificação do silenciamento gênico mediante a produção de novas moléculas de siRNA a partir de moléculas pré-existentes de siRNA produzidas pelo sistema RISC em plantas e nematóides (SIJEN et al., 2001; GHILDIYAL & ZAMORE, 2009). Isso sugere que nesses insetos ocorre outro mecanismo que torna o processo sistêmico dentro do corpo do inseto (HUVENNE & SMAGGHE, 2010) e o entendimento deste processo facilitaria a aplicação da tecnologia do RNAi no controle de insetos (YANG et al., 2012).

Quando o nível de transcritos do gene *rieske* nas larvas do 6º estágio de desenvolvimento foi avaliado, não foi observado diferença significativa na expressão do gene *rieske* entre os tratamentos (Figura 10), indicando a ausência do silenciamento gênico neste período, que corresponde ao 13 dia do experimento. Da mesma forma, conforme já demonstrado anteriormente, a taxa de mortalidade das larvas nesse período também não diferiu entre os tratamentos.

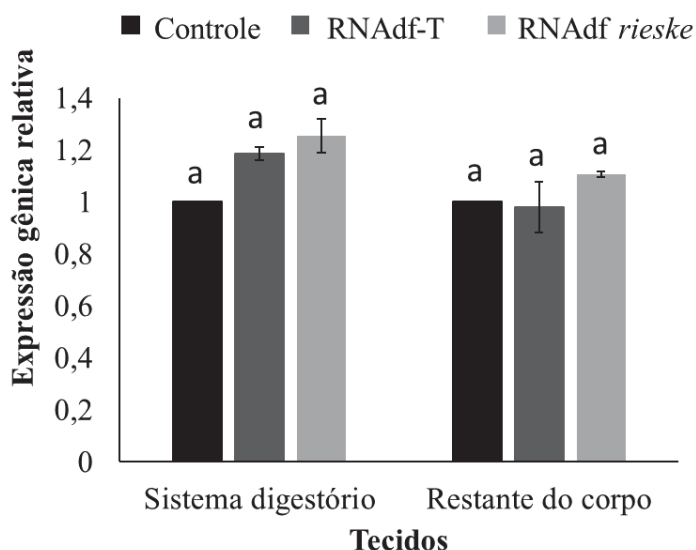


Figura 10 - Expressão do gene *rieske* nas larvas de 6º instar de *Helicoverpa armigera*, alimentadas com RNAdf *rieske*, RNAdf-T e controle. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Colunas com a mesma letra para cada grupo não diferem significativamente pelo teste T. Nas barras está indicado o erro padrão da média.

A suplementação da alimentação das larvas com discos foliares não tratados com RNAdf pode ter contribuído para a redução da eficiência do mecanismo de silenciamento por RNAi permitindo a sobrevivência e desenvolvimento normal das

larvas. Após o início da suplementação alimentar, que ocorreu a partir do quinto dia de experimento, cerca de 75% do consumo diário das larvas correspondeu à discos foliares não tratados, enquanto somente 25% da alimentação era com discos tratados com RNAdf na concentração de  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Reduzindo, dessa forma, a concentração de RNAdf no consumo total diário em relação aos cinco primeiros dias de experimento, quando as larvas foram alimentadas exclusivamente com discos foliares tratados com RNAdf. Assim, o fornecimento descontinuado do RNAdf pode ter causado o silenciamento transiente do gene *rieske*.

O silenciamento transiente foi observado em outros estudos, nos quais o gene voltou a se expressar em níveis normais mediante a supressão do fornecimento do RNAdf (GONG et al., 2011; ASOKAN et al., 2013; BURAND & HUNTER, 2013; ZHANG et al., 2015) ou ainda em níveis mais altos que o controle por um sistema de compensação de dose, como observado em *H. armigera* alimentada com o RNAdf do gene hormônio juvenil ácido metil transferase (*jhamt*) (ASOKAN et al., 2013).

Em larvas de *P. xylostella* alimentadas com siRNA do gene *rieske*, foi verificada redução da expressão do gene alvo em 6, 12, 24 e 48 horas após a alimentação, porém, após 72 horas, o gene *rieske* voltou a se expressar em níveis normais (GONG et al., 2011).

Em larvas de *H. armigera* em segundo estágio de desenvolvimento, alimentadas continuamente por 36 horas com  $35 \mu\text{g/g}$  de RNAdf do gene *transferrin* exibiram 99% de

silenciamento às 12, 24 e 36 horas, porém, o nível de transcrito as 48 horas aumentou 45%. Além disso, as larvas alimentadas com dieta artificial contendo 15 µg/g de RNAdf do gene *transferrin*, exibiram maior expressão do gene alvo em 48 horas em relação ao controle (ZHANG et al., 2015). Ainda, uma relação positiva direta do tempo de exposição das larvas de *Diabrotica virgifera virgifera* (LeConte) (Coleoptera: Chrysomelidae) ao RNAdf com a taxa de mortalidade alcançada foi observada por BOLOGNESI et al (2012). A alimentação contínua é requerida para um efeito sustentável do sistema de silenciamento mediado pelo RNAi (LIM et al.,2016).

Geralmente, a resposta do mecanismo de RNAi no silenciamento do gene alvo, na mortalidade e efeitos subletais no desenvolvimento das larvas de lepidópteros requer, além da disponibilização contínua, o uso de altas concentrações de RNAdf (TERENIUS et al., 2011; LIM et al., 2016).

O consumo de 60 e 80 µg de RNAdf do gene *chymotrypsin*, envolvido no sistema digestório, resultou na taxa de silenciamento significativamente maior do que a dose de 40 µg de RNAdf do gene *chymotrypsin* em larvas de *H. armigera*, enquanto doses menores, de 20 e 10 µg, não apresentaram silenciamento do gene alvo (ASOKAN et al., 2013). Mesmo mediante o fornecimento de altas doses de RNAdf e ocorrência do silenciamento gênico, esses autores não observaram nenhum efeito fenotípico nos insetos, demonstrando a complexidade do mecanismo de silenciamento por RNAi e que sua efetividade depende do gene alvo do silenciamento.

A integridade e captação do RNAdf pelas células intestinais do inseto alvo pode interferir na resposta do RNAi. O sistema digestório de lepidópteros é um ambiente hostil para ácidos nucleicos por possuir pH alcalino que contribui para o aumento da hidrólise química do RNAdf (TERRA et al., 1996) e contém numerosas RNAses que podem degradar o RNAdf ingerido (ZHANG et al., 2015). Estudos indicam a possibilidade de atividade de nucleases na saliva, intestino e hemolinfa de alguns insetos da ordem Lepidoptera (LIU et al., 2012; GARBUTT et al., 2013).

Considerando a taxa de mortalidade por estágio de desenvolvimento, as larvas de segundo instar foram mais suscetíveis ao RNAdf *rieske* diferindo estatisticamente da taxa de mortalidade das larvas do controle. No terceiro e quarto estágio de desenvolvimento e quando as larvas foram postas em dieta artificial não houve diferença estatística na taxa mortalidade entre os tratamentos (Figura 11).

Dois fatores sobrepostos podem estar reduzindo a mortalidade mediante a alimentação das larvas com RNAdf *rieske*: alimentação descontínua e o efeito do estágio de desenvolvimento.

Larvas neonatas são mais sensíveis ao RNAi, especialmente quando são mantidas sem alimentação antes de serem alimentadas com o RNAdf (TERENIUS et al., 2011). Em larvas mantidas sem alimento a degradação do RNAdf no sistema digestório é menor, o que pode ser um fator importante no aumento da sensibilidade ao RNAdf (RODRÍGUEZ-CABRERA et al., 2010).

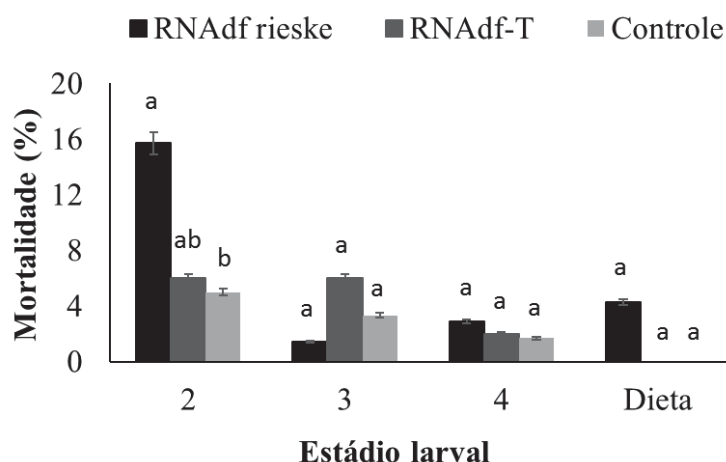


Figura 11 – Mortalidade de *Helicoverpa armigera* no 2º, 3º e 4º ínstar e quando as larvas foram postas em dieta artificial, após atingirem o 6º estágio de desenvolvimento. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS. Colunas de cada estágio de desenvolvimento e dieta com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey,  $P < 0,05$ . Nas barras está indicado o desvio padrão.

Em relação ao consumo (Tabela 4) e ao ganho de peso durante o desenvolvimento larval e peso de pupa (Tabela 5), apesar das larvas alimentadas com RNAdf *rieske* apresentarem uma tendência de redução no consumo, não houve diferença estatística entre os tratamentos para estas variáveis.

Tabela 4 – Consumo médio total das larvas de *Helicoverpa armigera*, considerando o consumo de discos foliares tratados e não tratados com RNAdf *rieske*, durante os 17 dias de experimento em que as larvas foram alimentadas com discos foliares de soja. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS

	Média (cm <sup>2</sup> )	CV (%)	N
<b>Controle</b>	21,61 <sup>ns</sup>	27,65	60
<b>RNAdf <i>Rieske</i></b>	18,28	43,03	70
<b>RNAdf-T</b>	20,21	32,17	50

Ns= não significativo pelo teste Tukey  $P < 0,05$ .



Tabela 5 – Ganho de peso das larvas de *Helicoverpa armigera* entre os dias 6 e 12, quando a alimentação era composta por discos foliares de soja e, peso de pupa, após as larvas serem transferidas para dieta artificial sem RNAdf *rieske*. FAMV/UPF, Passo Fundo, RS

	Ganho de peso dia 6-12 (g)			Peso de pupa (g)		
	Média	CV (%)	N	Média	CV (%)	N
<b>Controle</b>	71,11 <sup>ns</sup>	11,50	54	292,91 <sup>ns</sup>	2,42	35
<b>RNAdf <i>Rieske</i></b>	73,49	15,14	56	276,66	2,44	39
<b>RNAdf-T</b>	76,79	9,29	42	274,16	3,95	20

Ns= não significativo pelo teste Tukey P<0,05.

A ausência de efeitos subletais no presente trabalho pode ser explicado pela alimentação intercalada entre discos foliares contendo RNAdf *rieske* e discos não tratados, a partir do 5º dia do experimento, que também causou um silenciamento transiente. Mamta et al. (2016) alimentaram continuamente larvas de *H. armigera* com plantas de tabaco e tomate geneticamente modificados expressando siRNA do gene *Chitinase* e observou que as larvas pareciam ter desenvolvimento normal por 2-3 dias. Porém, após cinco dias observaram menor crescimento e desenvolvimento e a taxa de mortalidade foi significativamente maior que o controle.

A alimentação de *H. armigera* com 0,3 µg.cm<sup>-2</sup> de RNAdf *rieske* a cada dois dias não afetou o desempenho biológico das larvas. Em contraste com os dados observados no experimento I, em que as larvas alimentadas com 0,3 µg.cm<sup>-2</sup> de RNAdf *rieske* apresentaram, além da maior taxa de mortalidade, redução no consumo, peso e tamanho, apesar de terem sido alimentadas com discos foliares contendo RNAdf somente nos dias 0, 2 e 4.

No experimento I, o número reduzido de repetições pode ter interferido nos resultados obtidos. Variações genéticas das larvas podem ter contribuído nos resultados tendo sido considerados como variações decorrentes dos tratamentos. Além disso, variações entre experimentos com RNAi são comuns e têm sido relatados por alguns autores (TERENIUS et al., 2011).

A disponibilização via oral de RNAdf apresenta algumas desvantagens, como a degradação de RNAdf no intestino do inseto, ausência da enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e, conseqüentemente, disponibilização contínua de altas doses de RNAdf para obtenção de bons resultados. Apesar disso, a alimentação com RNAdf é um método atrativo por não ser invasivo e, futuramente abrir a possibilidade do desenvolvimento de novas estratégias de controle de pragas pela produção de plantas geneticamente transformadas produzindo RNAsdf específicos para o inseto alvo (PRICE & GATEHOUSE, 2008).

Resultados promissores têm sido obtidos para vários insetos da ordem Lepidoptera, porém, uma série de estudos sem sucesso tem sido demonstrados para *H. armigera* (TERENIUS et al., 2011). Para este inseto, a escolha do gene alvo, a dosagem e a metodologia de disponibilização do RNAdf/siRNA interferem nos resultados de silenciamento, mortalidade e efeitos subletais obtidos (MAO et al., 2007; ASOKAN et al., 2013; ZHANG et al., 2015).

A ocorrência de resultados contrastantes em relação à mortalidade e efeitos subletais no experimento I e II, pode ser decorrente do baixo número de repetições no experimento I. Foi

verificada a ocorrência de silenciamento no experimento II, dados não avaliados anteriormente, a taxa de silenciamento verificada até o quinto dia foi suficiente para causar mortalidade significativa em relação aos controles. Porém, a alimentação intercalada com discos foliares de soja tratados e não tratados com RNAdf *rieske* interferiu no mecanismo de silenciamento por RNAi, como pode ser verificado na ausência de silenciamento nas larvas em sexto estágio de desenvolvimento.

Uma das alternativas para contornar as dificuldades encontradas é o teste de doses intermediárias entre 0,3 e 3  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  RNAdf *rieske*, alimentando as larvas continuamente com discos foliares tratados e aliando a análise dos caracteres fenotípicos com o estudo de expressão do gene *rieske* para melhor compreensão da dinâmica de funcionamento e reposta dos insetos ao RNAdf *rieske* para indução de silenciamento em *H. armigera*.

#### 4 CONCLUSÕES

O gene *rieske* tem potencial para utilização como gene alvo do silenciamento por RNAi para controle de *H. armigera*. O silenciamento e mortalidade das larvas de *H. armigera* foram mais proeminentes em condições de alimentação contínua com o RNAdf *rieske*.

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. A method for computing the effectiveness of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, v. 18, n. 15, p. 265-267, 1925.

AGGARWAL, N.; BRAR, D. S.; BASEDOW, T. Insecticide resistance management of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) and its effect on pests and yield of cotton in North India. *Journal of Plant Diseases and Protection*, v. 113, n. 3, p. 120–127, 2006.

ALI, A.; CHOUDHURY, R. A. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. *Tunisian Journal of Plant Protection*, v. 4, n. 1, p. 99-106, 2009.

ALVI, A. H. K.; SAYYED, A. H.; NAEEM, M.; ALI, M. Field Evolved Resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in Pakistan. *PLoS One*, v. 7, n. 10, e47309, 2012.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription–PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 2004.

ARAÚJO, A. C. *Luta biológica contra Heliothis armigera no ecossistema agrícola tomate de indústria*. Tese (Doutorado em Entomologia), Universidade de Évora, Évora, 1990.

ARNEMANN, J. A.; GUEDES, J. V. C.; STACKE, R. F.; MELO, A. A.; PERINI, C. R.; CURIOLETTI, L. E. *Helicoverpa armigera*: Até no inverno. *Cultivar Grandes Culturas*, v. 182, n. 1, p. 26-28, 2014.

ASGARI, S. MicroRNA functions in insect. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 43, n. 4, p. 388–397, 2013.

ASOKAN, R.; CHANDRA, G. S.; MANAMOHAN, M.; KUMAR, N. K. K. Effect of diet delivered various concentrations of double-stranded RNA in silencing a midgut and a non-midgut gene of *Helicoverpa armigera*. *Bulletin of Entomological Research*, v. 103, n. 5, p. 555-563, 2013.

\_\_\_\_\_. CHANDRA, G. S.; MANAMOHAN, M.; KUMAR, N. K. K.; SITA, T. Response of various target genes to diet-delivered dsRNA mediated RNA interference in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Pest Science*, v. 87, n. 1, p. 163-172, 2014.

ÁVILA, C. J.; VIVIAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. *Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de Helicoverpa armigera (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas*. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013. (Embrapa Agropecuária Oeste. Circular Técnica, 23).

AVILLA, C.; VARGAS-OSUNA, E.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; FERRÉ, J.; GONZÁLEZ-ZAMORA, J. E. Toxicity of several  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Spain. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 90, n. 1, p. 51-54.

BACHMAN, P. M.; BOLOGNESI, R.; MOAR, W. J.; MUELLER, G. M.; PARADISE, M. S.; RAMASESHADRI, P.; TAN, J.; UFFMAN, J. P.; WARREN, J.; WIGGINS, B.E.; LEVINE, S. L. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Transgenic Research*, v. 22, n. 6, p. 1207-1222, 2013.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, v. 116, n. 2, p.281–297, 2004.

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

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

BEREZIKOV, E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature Reviews Genetics*, v. 12, n. 12, p. 846-860, 2011.

BOLOGNESI, R.; RAMASESHADRI, P.; ANDERSON, J.; BACHMAN, P.; CLINTON, W.; FLANNAGAN, R.; ILAGAN, O.; LAWRENCE, C.; LEVINE, S.; MOAR, W.; MUELLER, G.; TAN, J.; UFFMAN, J.; WIGGINS, E.; HECK, G.; SEGERS, G. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLoS ONE*, v. 7, n. 10, e47534, 2012.

BOUCIAS, D. G.; PEDLAND, J. C. *Principles of insect pathology*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998. 537 p.

BURAND, J. P.; HUNTER, W. B. RNAi: Future in insect management. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 112, n. 1, p. 68-77, 2013.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 25, n. 1, p. 169-193, 2000.

\_\_\_\_\_. BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. (2009) The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

BUTLER Jr., G. D.; WILSON, L.T.; HENNEBERRY, T. J. *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae): initiation of summer diapause. *Journal of Economic Entomology*, v. 78, p. 320-324, 1985.

CARNEIRO, A. A.; GUIMARÃES, C. T.; VALICENTE, F. H.; WAQUIL, J. M.; VASCONCELOS, M. J. V.; CARNEIRO, N. P.; MENDES, S. M. *Milho Bt: teoria e prática da produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 25 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 135).

CHANDRA, G. S.; ASOKAN, M. M.; MANAMOHAN, M.; KUMAR, N. K. K.; SITA, T. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Molecular Biology*, v. 48, n. 6; p. 813-822, 2014.

CHOMCZYNSKI, P.; MACKEY, K. Short technical report. Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*, v. 19, n. 1, p. 942-500, 1995.

COSTA, M.; DURO, N.; BATISTA-SANTOS, P.; RAMALHO, J. C.; RIBEIRO-BARROS, A. Validation of candidate reference genes for qRT-PCR studies in symbiotic and nonsymbiotic *Casuarina glauca* Sieb. ex Spreng. under salinity conditions. *Symbiosis*, v. 66, n. 1, p. 21-35, 2015.

CUNNINGHAM, J. P.; ZALUCKI, M. P. Understanding heliothine pests: What is a host plant? *Journal of Economic Entomology*, v. 107, n. 3, p. 881-896, 2014.

\_\_\_\_\_. ZALUCKI, M. P.; WEST, S. A. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): A new look at the behavior and control of a polyphagous pest. *Bulletin of Entomological Research*, v. 89, p. 201-207, 1999.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M.; GUIMARÃES, H. O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 43, n. 1, p. 110-113, 2013.

DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, v. 50, p. 227-230, 2010.

DING, S. W. RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology*, v.10, n. 9, p. 632-644, 2010.

DOWNES, S.; MAHON, R. Successes and challenges of managing resistance in *Helicoverpa armigera* to Bt cotton in Australia. *GM Crops & Food*, v. 3, n. 3, p. 228–234, 2012.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION (EPPO). Data sheets on quarantine organisms n° 110: *Helicoverpa armigera*. Paris: EPPO, 1981. (Bulletin, 11).

FERREIRA, M. R. *Cinética do desenvolvimento de Heliothis armigera*. Trabalho Fim de curso de Eng. Agrícola, Universidade de Évora, Évora, 1989.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 391, n. 19, p. 806-811, 1998.

FIREMPONG, S.; ZALUCKI, M. P. Host plant selection by *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): the role of some herbivore attributes. *Australian Journal of Zoology*, v. 39, n. 3, p. 343-350, 1991.

FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Annual Review of Entomology*, v. 34, n. 1, p. 17-52, 1989.

\_\_\_\_\_. DILLON, M. L.; HAMILTON, J. G. Spatial dynamics of *Helicoverpa* populations in Australia: simulation modeling and empirical studies of adult movement. *Computers and Electronics in Agriculture*, v. 13, p. 177-192, 1995.

FIUZA, L. M.; NIELSEN-LEROUX, C.; GOZE, E.; FRUTOS, R.; CHARLES, J. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera:Pyralidea): evidence of shared binding sites. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 5, p. 1544-1549, 1996.



FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p. 126-139, 2006.

FU, W.; XIE, W.; ZHANG, Z.; WANG, S.; WU, Q.; LIU, Y.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Exploring valid reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *International Journal of Biological Sciences*, v 9, n. 8, p. 792-802, 2013.

GARBUTT, J. S.; BELLES, X.; RICHARDS, E. H.; REYNOLDS, S. E. Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*. *Journal of Insect Physiology* v. 59, n. 2, p. 171-178, 2013.

\_\_\_\_\_. REYNOLDS, S. E. Induction of RNA interference genes by doublestranded RNA; implications for susceptibility to RNA interference. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 42, n. 9, p. 621-628, 2012.

GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics*, v. 10, n. 2, p. 94-108, 2009.

GIBSON, U. E.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, v. 6, n. 10, p. 995-1001, 1996.

GLARE, E. M.; DIVJAK, M.; BAILEY, M. J.; WALTERS, E. H. Beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalizing mRNA levels. *Thorax*, v. 57, n. 9, p. 765-770, 2002.

GONG, L.; YANG, X.; ZANG, B.; ZHONGA, G.; HUA, M. Y. Silencing of Rieske iron-sulfur protein using chemically synthesised siRNA as a potential biopesticide against *Plutella xylostella*. *Pest Management Science*, v. 67, n. 5, p. 514-520, 2010.

GORDON, K., WATERHOUSE, P. Small RNA viruses of insects and their expression in plants. *Advances in Virus Research*, v. 68, p. 459–502, 2006.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial diet. *Journal of Economic Entomology*, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

GU, L.; KNIPPLE, D. C. Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies. *Crop Protection*, v. 45, n. 1, p. 36-40, 2013.

GUEDES, J. V. C.; ARNEMANN, J. A.; PERINI, C. R.; ARRUE, A.; ROHRIG, A. Manejar ou perder. *Revista Cultivar Grandes Culturas*, v. 176, p. 12-16, 2013.

GUJAR, G.T.; KALIA, V.; KUMARI, A.; SINGH, B. P.; MITTAL, A.; NAIR, R.; MOHAN, M. *Helicoverpa armigera* baseline susceptibility to *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry toxins and resistance management for Bt cotton in India. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 95, n. 9, p. 214-219, 2007.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, v. 81, n. 4, p. 611-620, 1995.

HAMMOND, S. M.; BOETTCHER, S.; CAUDY, A. A.; KOBAYASHI, R.; HANNON, G. J. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, v. 293, n. 5532, p. 1146-1150, 2001.

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

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, v.53, n. 2, p. 242-255, 1989.

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.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS (ISSA). *GM approval database*. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase>>. Acesso em: 15 de jan. 2016.

JOSE, A. M.; HUNTER, C. P. Transport of sequence-specific RNA interference information between cells. *Annual Review of Genetics*, v. 41, p. 305-330, 2007.

\_\_\_\_\_. SMITH, J. J.; HUNTER, C. P. Export of RNA silencing from *C. elegans* tissues does not require the RNA channel SID-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 106, n. 7, p. 2283-2288, 2009.

KIM, Y. H.; ISSA M. S.; COOPER, A. M. W.; ZHU, K. Y. RNA interference: Applications and advances in insect toxicology and insect pest management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 120, p. 109-117, 2015.

KUMAR, M.; GUPTA, G. P.; RAJAM, M. V. Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. *Journal of Insect Physiology*, v. 55, n. 3, p. 273-278, 2009.

LAMMERS, J. W.; MACLEOD, A. *Report of a pest risk analysis: Helicoverpa armigera (Hübner, 1808)*. 2007. Disponível em: <<http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/helicoverpa.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

LEITE, N. A.; ALVES-PERERIRA, A.; CORRÊA, A. S.; ZUCCHI, M. I.; OMOTO, C. Demographics and genetics variability of the new world Bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old world Bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. *Plos One*, v. 9, n. 11, e113286, 2014.

LERECLUS, D. Génétique et biologie moléculaire de *Bacillus thuringiensis*. *Bulletin de Institut Pasteur*, v. 86, p. 337-371, 1988.

LIM, Z. X.; ROBINSON, K. E.; JAIN, R. G.; CHANDRA G. S.; ASOKAN, R.; ASGARI, S.; MITTER, N. Diet-delivered RNAi in *Helicoverpa armigera* - Progresses and challenges. *Journal of Insect Physiology*, v. 85, p. 86-93, 2016.

LIPARDI, C.; WEI, Q.; PATERSON, B. M. RNAi as random degradative PCR: siRNA *primers* convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*, v. 107, n. 3, p. 297-307, 2001.

LIU, F.; WANG, X.; ZHAO, Y.; LI, Y.; LIU, Y.; SUN, J. Silencing the HaAK gene by transgenic plant-mediated RNAi impairs larval growth of *Helicoverpa armigera*. *International Journal of Biological Sciences*, v. 11, n. 1, p. 67-74, 2015.

LIU, J.; SWEVERS, L.; IATROU, K.; HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. *Bombyx mori* DNA/RNA non-specific nuclease: expression of isoforms in insect culture cells, subcellular localization and functional assays. *Journal of Insect Physiology*, v. 58, n. 8, p. 1166-1176, 2012.

LIU, Z. D.; GONG, P.; WU, K.; SUN, J.; LI, D. A true summer diapause induced by high temperatures in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology*, v. 52, n. 10, p. 1012-1020, 2006.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LU, Y.; YUAN, M.; GAO, X.; KANG, T.; ZHAN, S.; WAN, H.; LI, J. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS One*, v. 8, n. 7, e68059, 2013.

\_\_\_\_\_. ZHENG, X.; LIANG, Q.; XU, H.; YANG, Y.; TIAN, J. Evaluation and validation of reference genes for SYBR green qRT-PCR normalization in *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v. 18, n. 4, p. 669-675, 2015.

MAELZER, D. A.; ZALUCKI M. P. Analysis and interpretation of longterm light-trap data for *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: the effect of climate and crop host plants. *Bulletin of Entomological Research*, v. 89, n. 5, 455-464, 1999.

MAMTA; REDDY, K. R. K.; RAJAM, M. V. Targeting chitinase gene of *Helicoverpa armigera* by host-induced RNA interference confers insect resistance in tobacco and tomato. *Plant Molecular Biology*, v. 90, n. 3, p. 281-292, 2016.

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

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

\_\_\_\_\_. ZHANG, P.; LIU, C.; ZENG, F. Co-silence of the coatomer b and v-ATPase A genes by siRNA feeding reduces larval survival rate and weight gain of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 118, p. 71-76, 2015.

MATRANGA, C.; ZAMORE, P. D. Small silencing RNAs. *Current Biology*, v. 17, n. 18, p. 789-793, 2007.

McCAFFREY, A. R. Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera: a global view. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, v. 353, n. 1376, p. 1735-1750, 1998.

MENSAH, R. K. Supression of *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition by use of the natural enemy food supplement Envirofeast. *Australian Journal of Entomology*, v. 35, n. 4, p. 323-329, 1996.

MERKLING, S. H.; VAN RIJ, R. P. Beyond RNAi: antiviral defense strategies in Drosophila and mosquito. *Journal of Insect Physiology*, v. 59, n. 2, p. 159-170, 2013.

MIRONIDIS, G. K.; SAVOPOULOU-SOULTANI, M. Development, survivorship, and reproduction of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) under constant and alternating temperatures. *Environmental Entomology*, v. 37, n. 1, p. 16-28, 2008.

MONTGOMERY, M. K.; XU, S.; FIRE, A. RNA as a target of dsRNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 26, p. 15502-15507, 1998.

MORAL-GARCIA, F. J. Analysis of the spatiotemporal distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) in a tomato field using a stochastic approach. *Biosystems Engineering*, v. 93, n. 3, p. 253-259, 2006.

MOSCARDI, F.; BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; CORSO, I. C.; YANO, S. A. C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, B. C.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*. Brasília: Embrapa, 2012. p. 213-333.

MURÚA, M. G.; SCALORA, F. S.; NAVARRO, F. R.; CAZADO, L. E.; CASMUZ, A.; VILLAGRÁN, M. E.; LOBOS, E.; GASTAMINZA, G. First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. *Florida Entomologist Society*, v. 97, n. 2, p. 854-856, 2014.

NAPOLI, C. A.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthetase gene in *Petunia* results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, v. 2, n. 4, p. 279-289, 1990.

NASERI, B.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR, S.; HOSSEININAVEH, V. Comparative reproductive performance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) reared on thirteen soybean varieties. *Journal of Agricultural Science and Technology*, v. 13, n. 1, p. 17-26, 2011.

NASREEN, A.; MUSTAFA, G. Biology of *Helicoverpa armigera* (Hbn) reared in laboratory on natural diet. *Pakistan Journal of Biological Science*, v. 3, n. 10, p. 1668-1669, 2000.

NORTH AMERICAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. *Helicoverpa armigera* (Old World Bollworm) - Detection in Florida. Disponível em: <<http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=629&keyword=Helicoverpa%20armigera>>. Acesso em: 10 jan 2016.

PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. *Trends in Biotechnology*, v. 15, n. 5, p. 173-177, 1997.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper Excel-based tool using pairwise correlations. *Biotechnology Letters*, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.

PINÓIA S. S. F. *Eficácia de Bacillus thuringiensis (Berliner) e spinosade no combate a Helicoverpa armigera (Hbn) (Lepidoptera:Noctuidae) em tomateiro*. 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2012. Disponível em: <<https://www.repository.utl.pt/bitstream>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

PITINO, M.; COLEMAM, A. D.; MAFFEI, M. E.; RIDOUT, C. J.; HOGENHOUT, S. A. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS One*, v. 6, n. 10, e25709, 2011.

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

QI, Y.; HANNON, G. J. Uncovering RNAi mechanisms in plants: biochemistry enters the foray. *FEBS Letters*, v. 579, n. 26, p. 5899-5903, 2005.

RADONIC, A.; THULKE, S.; MACKAY, I. M.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 313, n. 4, p. 856-862, 2004.

RAHMAN, M.; ALI, I.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. RNA interference: The story of gene silencing in plants and humans. *Biotechnology Advances*, v. 26, n. 3, p. 202-209, 2008.

RAMOS, J. E.; SHATTERS, R. G.; POWELL, C. A.; BOROVSKY, D.; JAIN, R.; SHAFFER, L.; BENMAHMOUD, S. K. RNA interference screening reveals redox processes to be most responsive to low dsRNA doses in Asian Citrus Psyllid. *Journal of Citrus Pathology*, v. 1, p. 156, 2014.

REIGADA, C.; GUIMARÃES, K. F.; PARRA, J. R. P. Relative Fitness of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on Seven Host Plants: A Perspective for IPM in Brazil. *Journal of Insect Science*, v. 16, n. 1, p. 1-5, 2015.

RIESKE, J. S.; MacLENNAN, D. H.; COLEMAN, R. Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome C reductase complex of the respiratory chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 15, n. 4, p. 338-344, 1964.

RODRÍGUEZ-CABRERA, L.; TRUJILLO-BACALLAO, D.; BORRÁS-HIDALGO, O.; WRIGHT, D. J.; AYRAPARDO, C. RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsinlike serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 11, p. 2894-903, 2010.



RÖTHER, S.; MEISTER, G. Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. *Biochimie*, v. 93, n. 11, p. 1905-1915, 2011.

SALEH, M. C.; VAN RIJ, R. P.; HEKELE, A.; GILLIS, A.; FOLEY, E.; O'FARRELL, P. H.; ANDINO, R. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature Cell Biology*, v. 8, n. 8, p. 793-802, 2006.

SALVADORI, J. R.; PEREIRA, P. R. V. da S.; SPECHT, A. *Helicoverpa armigera* no Sul. *Cultivar Grandes Culturas*, v. 176, n. 15, p. 22-23, 2013.

\_\_\_\_\_. PEREIRA, P. R. V. da; SPECHT, A. Registro da ocorrência de *Helicoverpa armigera* no Rio Grande do Sul, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 25, 2014, Goiânia. *Anais eletrônicos...* Goiânia: Embrapa, 2014.

\_\_\_\_\_. SUZANA, C. S. Saldo da *Helicoverpa*. *Cultivar Grandes Culturas*, v. 15, n. 187, p. 26-28, 2014.

\_\_\_\_\_. SUZANA, C. S. *Conhecendo e manejando a lagarta Helicoverpa armigera em soja*. Disponível em: <<http://www.lavourasempragas.com.br/especialistas/joseroberto-salvadori/conhecendo-e-manejando-a-lagarta-helicoverpa-armigera-em-soja.html>>. Acesso em: 15 jan 2016.

SANTOS, A. E.; MENDES, S. M.; CARVALHO, S. S. S.; SILVA, L. O.; CARVALHO, E. A. R.; BATISTA, C. S.; NASCIMENTO, T. A., SANTOS, C. A. Aspectos biológicos de *Helicoverpa* sp e, folhas de algodão e soja. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC/BIC JÚNIOR, 6., 2014, Sete Lagoas. (Trabalhos apresentados). Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2014.

SCHARLAKEN, B.; DE GRAAF, D. C.; GOOSSENS, K.; BRUNAIN, M.; PEELMAN, L. J.; JACOBS, F. J. Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: the head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. *Journal of Insect Science*, v. 8, n. 33, p. 1-10, 2008.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 3, p.775-806, 1998.

SCOTT, J. G.; MICHEL, K.; BARTHOLOMAY, L. C.; SIEGFRIED, B. D.; HUNTER, W. B.; SMAGGHE, G.; ZHU, K. Y.; DOUGLAS, A. E. Towards the elements of successful insect RNAi. *Journal of Insect Physiology*, v. 59, n. 12, p. 1212-1221, 2013.

SELVEY, S.; THOMPSON, E. W.; MATTHAEI, K.; LEA, R. A.; IRVING, M. G.; GRIFFITHS, L. R. Betaactin an unsuitable internal control for RT-PCR. *Molecular and Cellular Probes*, v. 15, n. 5, p. 307-311, 2001.

SENAVE. Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas. *Asunción: Senave en alerta tras ingreso de peligrosa plaga agrícola*, 2013. Disponível em: <<http://www.abc.com.py/edicionimpresa/economia/senave-en-alerta-trasingreso-de-peligrosa/plagaagricola-629240.html>>. Acesso em: 15 janeiro de 2016.

SHABAB, M.; KHAN, S. A.; VOGEL, H.; HECKEL, D. G.; BOLAND, W. OPDA isomerase GST16 is involved in phytohormone detoxification and insect development. *FEBS Journal*, v. 281, n. 12, p. 2769-2783, 2014.

SHAKEEL, M.; ZHU, X.; KANG, T.; WAN, H.; LI, J. Selection and evaluation of reference genes for quantitative gene expression studies in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v. 18, n. 2, p. 123-130, 2015.

SIJEN, T.; FLEENOR, J.; SIMMER, F.; THIJSEN, K. L.; PARRISH, S.; TIMMONS, L.; PLASTERK, R. H. A.; FIRE, A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, v. 107, n. 4, p. 465-476, 2001.

SOUTHWOOD, T. R. E. Habitat, the templet for ecological strategies? *Journal of Animal Ecology*, v. 46, p. 337-365, 1977.

SPECHT, A.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PAULA-MORAES, S. V.; YANO, S. A. C. Morphological and molecular identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and expansion of its occurrence record in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, n. 6, p. 689-692, 2013.

SUZANA, C. S.; DAMIANI, R.; FORTUNA, L. S.; SALVADORI, J. R. Desempenho de larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes fontes alimentares. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 45, n. 4, p. 480-485, 2015

TENG, X.; ZHANG, Z.; HE, G.; YANG, L.; LI, F. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in four lepidopteran insects. *Journal of Insect Science*, v. 12, n. 60, p. 1-17, 2011.

TERENIUS, O.; PAPANICOLAOU, A.; GARBUTT, J. S.; ELEFThERIANOS, I.; HUVENNE, H.; KANGINAKUDRU, S.; ALBRECHTSEN, M.; AN, C.; AYMERIC, J. -L.; BARTHEL, A.; BEBAS, P.; BITRA, K.; BRAVO, A.; CHEVALIER, F.; COLLINGE, D. P.; CRAVA, C. M.; DE MAAGD, R. A.; DUVIC, B.; ERLANDSON, M.; FAYE, I.; FELFÖLDI, G.; FUJIWARA, H.; FUTAHASHI, R.; GANDHE, A. S.; GATEHOUSE, H. S.; GATEHOUSE, L. N.; GIEBULTOWICZ, J. M.; GÓMEZ, I.; GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. P.; GROOT, A. T.; HAUSER, F.; HECKEL, D. G.; HEGEDUS, D. D.; HRYCAJ, S.; HUANG, L.; HULL, J. J.; IATROU, K.; IGA, M.; KANOST, M. R.; KOTWICA, J.; LI, C.; LI, J.; LIU, J.; LUNDMARK, M.; MATSUMOTO, S.; MEYERING-VOS, M.; MILLICHAP, P. J.; MONTEIRO, A.; MRINAL, N.; NIIMI, T.; NOWARA, D.; OHNISHI, A.; OOSTRA, V.; OZAKI, K.; PAPAKONSTANTINO, M.; POPADIC, A.; RAJAM, M. V.; SAENKO, S.; SIMPSON, R. M.; SOBERÓN, M.; STRAND, M. R.; TOMITA, S.; TOPRAK, U.; WANG, P.; WEE, C. W.; WHYARD, S.; ZHANG, W.; NAGARAJU, J.; FRENCH-CONSTANT, R. H.; HERRERO, S.; GORDON, K.; SWEVERS, L.; SMAGGHE, G. 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.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; BAKER, J. E.; Compartmentalization of digestion. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. (Eds.), *Biology of the Insect Midgut*. London: Springer, 1996, p. 206-235.

THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; BORMAN, B. D.; COUMANS, B.; HENNEN, G.; GRISAR, T.; IGOUT, A.; HEINEN, E. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. *Journal of Biotechnology*, n. 75, n. 2, p. 291-295, 1999.

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

ULVILA, J.; PARIKKA, M.; KLEINO, A.; SORMUNEN, R.; EZEKOWITZ, R. A.; KOCKS, C.; RAMET, M. 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.

VAN RIJ R. P.; BEREZIKOV, E. Small RNAs and the control of transposons and viruses in *Drosophila*. *Trends Microbiology*, v. 17, n. 4, p. 163-171, 2009.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, v. 3 n. 7, p. 1-12, 2002.

VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, v. 44, n. 5, p. 619-626, 2008.

WARDHAUGH, K. G., ROOM, P. M.; GREENUP, L. R. The incidence of *Heliothis armigera* (Hübner) and *H. punctigera* Wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton and other host-plants in the Namoi Valley of New South Wales. *Bulletin of Entomological Research*, v. 70, n. 1, p. 113-131, 1980.

WEI, J.; GUO, Y.; LIANG, G.; WU, K.; ZHANG, J.; TABASHNIK, B. E.; LI, X. Cross-resistance and interactions between Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab against the cotton bollworm. *Scientific Reports*, v. 5, n. 7714, p. 1-7, 2015.

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.

WINTER, J.; JUNG, S.; KELLER, S.; GREGORY, R.; DIEDERICHS, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, v. 11, n. 3, p. 228-234, 2009.

YANG, G.; YOU, M.; VASSEUR, L.; ZHAO, Y.; LIU, C. Development of RNAi in insects and RNAi-based pest control. In: STOYTCHIEVA, M. (Ed). *Pesticides in the modern world - Pest control and pesticides exposure and toxicity assessment*. Croácia: In Tech, 2011 p. 27-38.

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

YU, N.; CHRISTIAENS, O.; LIU, J. M.; NIU, J.; CAPPELLE, K.; CACCIA, S.; HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect Science*, v. 20, n. 1, p. 4-14. 2013.

ZAMORE, P. D.; TUSCHL, T.; SHARP, P.A.; BARTEL, D. P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, v. 101, n. 1, p. 25-33, 2000.

ZEDDAM, J. L.; GORDON, K. H.; LAUBER, C.; ALVES, C. A.; LUKE, B. T.; HANZLIK, T. N.; WARD, V. K.; GORBALENYA, A. E. *Euprosterina elaeasa* virus genome sequence and evolution of the Tetraviridae family: emergence of bipartite genomes and conservation of the VPg signal with the dsRNA Birnaviridae family. *Virology* 397, n. 1, p. 145-154, 2010.

ZHA, W.; PENG, X.; CHEN, R.; DU, B.; ZHU, L.; HE, G. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the Hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS One*, v. 6, n. 5, e20504, 2011.

ZHANG, H.; LI, H. C.; MIAO, X. X. Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control: RNAi-based technology in insect pest control. *Insect Science*, v. 20, n. 1, p. 15-30, 2013.

ZHANG, S.; AN, S.; LI, Z.; WU, F.; YANG, Q.; LIU, Y.; CAO, J.; ZHANG, H.; ZHANG, Q.; LIU, X. Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae). *Gene*, v. 555, p. 393-402, 2015.

ZHANG, L.; SHANG, Q.; LU, Y.; ZHAO, Q.; GAO, X. A transferrin gene associated with development and 2-tridecanone tolerance in *Helicoverpa armigera*. *Insect Molecular Biology*, v. 24, n. 2, p. 155-166, 2015.

ZHOU, X.; COLL, M.; APPLEBAUM, S. W. Effect of temperature and photoperiod on juvenile hormone biosynthesis and sexual maturation in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*: implications for life history traits. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 30, n. 8-9, p. 863-868, 2000.

ZHU, X.; YUAN, M.; SHAKEEL, M.; ZHANG, Y.; WANG, S.; WANG, X.; ZHAN, S.; KANG, T.; LI, J. Selection and Evaluation of Reference Genes for Expression Analysis Using qRT-PCR in the Beet Armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS One*, v. 9, n. 1, e84730, 2014.