

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

**Plantas transgênicas de tabaco expressando RNA *hairpin* e Jaburetox
como estratégias para controle de *Helicoverpa armigera***

Cássia Canzi Ceccon

Passo Fundo

2019

Cássia Canzi Ceccon

Plantas transgênicas de tabaco expressando RNA *hairpin* e Jaburetox como estratégias para controle de *Helicoverpa armigera*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Doutora em Agronomia.

Orientador:
Dr. José Roberto Salvadori
Coorientador:
PhD. Magali Ferrari Grandó

Passo Fundo

2019

CIP – Catalogação na Publicação

C387p Ceccon, Cássia Canzi

Plantas transgênicas de tabaco expressando RNA *hairpin* e Jaburetox como estratégias para controle de *Helicoverpa armigera* / Cássia Canzi Ceccon. – 2019.

123 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Dr. José Roberto Salvadori.

Coorientadora: PhD. Magali Ferrari Grando.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2019.

1. Insetos nocivos - Controle. 2. Plantas transgênicas.
3. Fumo - Melhoramento genético. I. Salvadori, José Roberto, orientador. II. Grando, Magali Ferrari, coorientadora.
III. Título.

CDU: 633.71

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

“Plantas transgênicas de tabaco expressando RNA *hairpin* e Jaburetox como estratégias para controle de *Helicoverpa armigera*”

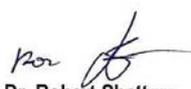
Elaborada por

Cássia Canzi Ceccon

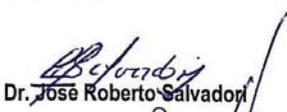
Como requisito parcial para a obtenção do grau de
“Doutora em Agronomia – Área de Produção e Proteção de Plantas”

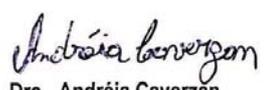
Aprovada em: 09/04/2019
Pela Comissão Examinadora


Dr. Edson Campanhola Bortoluzzi
Presidente da Comissão Examinadora e
Coordenador PPGAgro

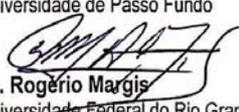

Dr. Robert Shatters
USDA - EUA


Dra. Magali Ferrari Grando
Coorientadora


Dr. José Roberto Salvadori


Dra. Andréia Caverzan
Universidade de Passo Fundo


Dr. Eraldo Lourenso Zanella
Diretor da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Universidade de Passo Fundo


Dr. Rogério Margis
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DEDICATÓRIA

À meus pais e meu marido, meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Ao final desta jornada, gostaria de agradecer, primeiramente, à minha família, meus pais, Carlos e Claudete, minhas irmãs, Francieli e Geovana. Obrigada pelo incentivo e apoio durante todo este período e pela compreensão dos momentos de ausência que foram dedicados ao trabalho e ao estudo e que me permitiram chegar até aqui.

Ao meu marido Gelson, pela paciência, compreensão e por participar dos momentos bons e difíceis durante esta jornada. Muito obrigada pelo incentivo e apoio, foram muito importantes para mim.

À profa. Magali Grando, além de orientadora, amiga e conselheira, muito obrigada pelos ensinamentos, pelo esforço em sempre tentar me fazer melhor a cada etapa, me incentivar a ir mais longe e buscar cada vez mais. Saibas que te tenho como um grande exemplo de pessoa e profissional.

Ao prof. José Roberto Salvadori, muito obrigada pelos ensinamentos, contribuições e auxílio durante esta trajetória. Tenho imensa admiração pelo seu trabalho e dedicação.

Ao Dr. Robert Shatters por me receber e possibilitar a realização do doutorado sanduíche, além de todo auxílio, ensinamentos e colaborações durante a execução deste trabalho.

À toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, especialmente à Dielli, Marília e Marilei, obrigada pela amizade e por sempre estarem dispostas a oferecer um ombro amigo nos momentos difíceis e compartilharem os bons momentos.

À equipe do laboratório de Entomologia pelo auxílio e disponibilidade, especialmente à Crislaine, obrigada pela amizade, pelas conversas e sugestões na execução deste trabalho.

À Universidade de Passo Fundo e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, estendendo-me aos professores que contribuíram em minha formação.

À Capes pela concessão da bolsa.

E, finalmente, a todos que de alguma forma estiveram presentes e contribuíram para que chegasse até aqui.

EPIGRAFE

“Educação é uma descoberta progressiva de nossa própria ignorância.”

(Voltaire)

RESUMO

CECCON, Cássia Canzi. Plantas transgênicas de tabaco expressando RNA hairpin e Jaburetox como estratégias para controle de *Helicoverpa armigera*. 2019. 123 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2019.

Helicoverpa armigera se destaca como inseto-praga em diversas regiões do mundo e apresenta populações resistentes a diversos grupos de inseticidas e toxinas Bt utilizados atualmente. Considerando estes fatores, é visível a necessidade da busca por novas estratégias com potencial de controle desta praga. Tecnologias como a disponibilização oral de moléculas de RNA de interferência (RNAi) que induzem a mortalidade e o silenciamento de genes vitais aos insetos-praga alvo e a utilização de novas biomoléculas inseticidas, como o peptídeo recombinante Jaburetox (JBTX), derivado de uma das isoformas de urease de *Canavalia ensiformes*, são estratégias que podem ser utilizadas para o controle de insetos-praga, incluindo *H. armigera*. O objetivo deste trabalho foi produzir plantas de tabaco geneticamente modificadas contendo os genes que expressam: 1) moléculas de RNA em forma de grampo (*hairpin* RNA-hpRNA) que forma a molécula de RNA dupla-fita (RNAdf) complementar ao gene *rieske* de *H. armigera* (hpRNA-*rieske*); e/ou, 2) o peptídeo entomotóxico Jaburetox (JBTX), e avaliar a eficácia na indução de mortalidade de larvas de *H. armigera* alimentadas com estas plantas. Foi verificado alta mortalidade e redução do consumo nas larvas alimentadas com os eventos R12/2 contendo o gene para a expressão do hpRNA-*rieske* e J22/4, contendo o gene para expressão do JBTX. A alimentação das larvas com os eventos hpRNA-*rieske* resultou na redução do nível de transcritos do gene *rieske* no sistema digestório e nos tecidos do restante do corpo das larvas, chegando a 85% de silenciamento. Utilizando os melhores eventos R12/2 e J22/4 foi obtido progênies de plantas empilhadas contendo ambos os genes de interesse pelos cruzamentos J22/4xR12/2 e R12/2xJ22/4. As plantas empilhadas, heterozigotas para ambos os genes, mostraram resposta semelhante ao parental R12/2. Esse progenitor apresenta segregação do transgenes que sugere que está em homozigose, porém, pode haver mais de uma cópia do gene hpRNA-*rieske* como resultado de múltiplas inserções no genoma. Hipotetiza-se que a avaliação dos híbridos J22/4 e R12/2 desenvolvidos no futuro para que apresentem homozigose para ambos os genes pode fornecer melhores resultados quanto ao potencial de controle de *H. armigera*. Além disso, mais estudos poderão indicar a ocorrência de interação entre as substâncias inseticidas e a viabilidade de utilização de ambas tecnologias em conjunto.

Palavras-chave: 1. RNA de interferência. 2. Peptídeo entomotóxico. 3. Controle de inseto-praga. 4. Empilhamento gênico.

ABSTRACT

CECCON, Cássia Canzi. Tobacco transgenic plants expressing RNA hairpin and Jaburetox as strategies for *Helicoverpa armigera* control. 2019. 123 f. Thesis (Doctor in Agronomy) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2019.

Helicoverpa armigera is a serious insect-pest in several regions of the world and there are reports of populations resistant to various groups of currently used insecticides and Bt toxins. Considering these factors, the need to search for new *H. armigera* control strategies is clear. Technologies such as oral delivery of RNA interference (RNAi) inducing molecules that induce mortality by silencing vital target pest genes and the use of new insecticidal biomolecules, such as the Jaburetox (JBTX) recombinant insecticidal peptide, derived from one of the *Canavalia ensiformes* urease isoforms, are strategies that can be used to control pest insect, including *H. armigera*. The objective of this work was to produce genetically modified tobacco plants containing genes expressing: 1) hairpin RNA molecules (hpRNA) that form double-strand RNA (dsRNA) complementary to the *H. armigera rieske* gene (hpRNA-*rieske*); and/or, 2) the entomotoxic Jaburetox peptide (JBTX), and evaluate their efficacy in inducing mortality in *H. armigera* fed on these plants. High mortality and reduced consumption were verified in larvae fed on the R12/2 event containing the gene encoding hpRNA-*rieske* and on J22/4 event containing the gene encoding the JBTX peptide. Feeding of the larvae with the hpRNA-*rieske* event resulted in a reduction in the level of the *rieske* gene transcripts in the digestive system and in the remaining tissues of the larvae body by 85%. Using the best events (R12/2 and J22/4) as parents, progenies of containing both genes of interest were obtained through the crosses J22/4xR12/2 and R12/2xJ22/4. These stacked plants, hemizygous for both genes, induced similar mortality in *H. armigera* as the R12/2 parent. This parent displays segregation of hpRNA-*rieske* in offspring suggesting it is homozygous; however, it could also carry more than one copy of hpRNA-*rieske* as a result of multiple insertions in the genome. It is hypothesized that the evaluation of J22/4 and R12/2 hybrids developed in the future to be homozygous for both genes may provide even higher control of *H. armigera*. In addition, further studies may indicate the occurrence of interaction between insecticidal substances and the feasibility of using both technologies together in a stacked approach.

Key words: 1. Interference RNA. 2. Entomotoxic peptide. 3. Insect pest control. 4. Gene stacking.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	<i>Helicoverpa armigera</i>	16
2.2	<i>RNA de interferência</i>	19
2.3	<i>Jaburetox</i>	27
2.4	<i>Empilhamento gênico</i>	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	<i>Construções gênicas</i>	35
3.1.1	Construção pMCG1005/S1/S2	39
3.1.2	Construção pMCG1005/JBTX	39
3.1.3	PCR	40
3.2	<i>Transformação genética de tabaco (Nicotiana tabacum)</i>	41
3.3	<i>Análises moleculares e bioensaios</i>	43
3.3.1	Geração R1 de plantas transgênicas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	43
3.3.2	Empilhamento gênico: cruzamento das plantas transgênicas hpRNA-rieske e Jaburetox	47
4	RESULTADOS	52
4.1	<i>Construções gênicas</i>	52
4.2	<i>Transformação genética de tabaco (Nicotiana tabacum)</i>	52
4.3	<i>Análises moleculares e bioensaios</i>	55
4.3.1	Geração R1 das plantas transgênicas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	55
4.3.2	Empilhamento gênico: cruzamento das plantas transgênicas hpRNA-rieske e Jaburetox	79
5	DISCUSSÃO	93
6	CONCLUSÃO	105
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
	REFERÊNCIAS	107
	ANEXOS	122
	<i>Anexo I Protocolo de transformação genética de tabaco utilizando A. tumefaciens (Horticultural Research Laboratory – USDA-ARS)</i>	123
	<i>Anexo II Meios de cultura utilizados no processo de transformação genética (Horticultural Research Laboratory – USDA-ARS)</i>	124

1 INTRODUÇÃO

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) se destaca pela polifagia, com ampla gama de hospedeiros incluindo plantas de importância agrícola. A característica desta espécie em atacar preferencialmente as partes reprodutivas da planta é o fator determinante para os prejuízos causados por esta praga.

A polifagia 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. As principais estratégias de controle de *H. armigera* incluem a utilização de cultivares resistentes, uso de inseticidas químicos e biológicos e o controle biológico além da utilização de plantas geneticamente modificadas contendo o gene *cry* oriundo da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillales: Bacillaceae). Porém há relatos de populações resistentes a diversos grupos de inseticidas e toxinas Bt.

Considerando os casos de resistência de *H. armigera* aos principais mecanismos de controle utilizados é visível a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias de controle. No âmbito da biotecnologia e transformação genética de plantas, destaca-se a busca por novas estratégias e genes que produzam substâncias inseticidas que possam ser utilizadas no controle de *H. armigera*.

O RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo de silenciamento gênico a nível pós-transcricional. O silenciamento de genes específicos se dá pelo processamento de moléculas de RNA dupla-fita (RNA_{df}) que atuam como desencadeadoras do mecanismo de silenciamento via RNAi. Este mecanismo tem sido avaliado como uma tecnologia com grande potencial para a utilização no controle de insetos-praga. Os efeitos entomotóxicos são derivados da supressão de genes essenciais à sobrevivência levando à mortalidade e/ou efeitos sub-letais.

Considerando a aplicação a campo, a disponibilização oral das moléculas desencadeadoras do processo de silenciamento gênico é a mais atrativa. Uma das técnicas de disponibilização via oral é a produção de plantas geneticamente modificadas contendo uma construção para expressão de uma estrutura de grampo de RNAdf (*hairpin* RNA – hpRNA). Estas plantas apresentam a vantagem de possibilitar a expressão contínua de hpRNA, fator importante em insetos com uma resposta mais recalcitrante ao mecanismo de RNAi, como é o caso de insetos da ordem Lepidoptera

Além do método de disponibilização, a escolha do gene a ser silenciado é de extrema importância na efetividade do silenciamento. O gene *rieske* codifica a proteína Iron-sulfur, componente do Citocromo bc1 da membrana mitocondrial, principal responsável pela cadeia de transferência de elétrons da mitocôndria e produção de ATP.

A efetividade da disponibilização de moléculas de RNAdf complementares a parte do gene *rieske* de *H. armigera* foi testado anteriormente. Os resultados demonstraram a efetividade do silenciamento, causando efeitos letais e subletais no desenvolvimento das larvas. Porém, a ocorrência do silenciamento e dos efeitos letais e subletais dependiam da administração contínua do RNAdf-*rieske*. Dessa forma, uma das alternativas é a utilização de plantas geneticamente modificadas contendo a construção para a expressão do hpRNA-*rieske*.

Algumas biomoléculas inseticidas de origem proteica também podem representar uma nova estratégia para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a insetos e uma alternativa a toxina BT. O peptídeo recombinante Jaburetox (JBTX), derivado de uma isoforma de urease de *Canavalia ensiformis* (L.) DC (Fabales: Fabaceae) apresenta efeito contra bactérias, fungos e diversas espécies de insetos de diferentes ordens, incluindo *H. armigera*.

A utilização de plantas com duas ou mais substâncias inseticidas podem aumentar a eficiência de controle e resultar na redução e/ou retardo no aparecimento de insetos resistentes, pois os insetos resistentes a uma toxina podem ser controlados pela outra toxina. O empilhamento gênico se refere ao processo de combinação de dois ou mais

genes de interesse no genoma de uma única planta e a utilização de métodos tradicionais de melhoramento para combinação de eventos expressando características de interesse é uma das maneiras mais rápidas e fáceis de obtenção de plantas com empilhamento gênico.

Dessa forma, o presente trabalho objetiva verificar: i) se é possível a obtenção de plantas geneticamente modificadas de tabaco contendo as construções para expressão do hpRNA-*rieske* e JBTX; ii) se as plantas produzidas apresentam potencial de controle de *H. armigera*; e iii) se plantas empilhadas contendo os genes para expressão de ambas substâncias inseticidas apresentam potencial de controle de *H. armigera* e viabilidade de utilização de ambas tecnologias em conjunto.

A estrutura deste documento engloba a revisão de literatura abordando os tópicos *Helicoverpa armigera*, RNA de interferência, Jaburetox e empilhamento gênico, seguido dos materiais e métodos utilizados na execução deste trabalho, resultados obtidos e discussão, finalizando com as conclusões e considerações finais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Helicoverpa armigera*

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) pertence ao complexo de lagartas da subfamília Heliothinae. A espécie encontra-se distribuída por toda a Europa, em países da Ásia, África, Oceania e América (EPPO, 1981; LAMMERS; MACLEOD, 2007; CZEPAK et al, 2013; SENA VE, 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).

Apesar de ter sido registrada no Brasil somente em 2013 é possível que *H. armigera* já estivesse no país antes disso. A distinção baseada somente em caracteres morfológicos entre *H. armigera* e outras espécies da subfamília Heliothinae como *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) ou até mesmo *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), é dificultada pela semelhança entre estas espécies. Além disso, *H. armigera* foi amplamente difundida no país em seu primeiro ano de ocorrência, um padrão de distribuição que geralmente demoraria muitos meses para ocorrer (BUENO et al., 2014; BUENO; SOSA-GÓMEZ, 2014).

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 trinta 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).

Uma ampla gama de espécies vegetais é hospedeira de *H. armigera* (> 45 famílias e > 180 espécies), incluindo plantas agrícola importantes (FITT, 1989; TAY et al., 2013). Em geral, no Brasil, as culturas mais importantes atacadas por *H. armigera* são algodão, soja, milho, vagem, tomate, citrus e pastagens. Porém, *H. armigera* também foi encontrada se alimentando de plantas daninhas (BUENO; SOSA-GÓMEZ, 2014, POMARI-FERNANDES et al., 2015).

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).

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 polífagas, como *H. armigera* (SANTOS et al., 2014).

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).

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 (AVILLA et al., 2005). Porém, há relatos de populações de *H. armigera* resistentes, tanto a alguns grupos de inseticidas quanto a eventos de plantas geneticamente modificadas contendo o gene *cry* (McCAFFERY, 1998; ALVI et al., 2012; DOWNES; MAHON 2012; WEI et al., 2014).

Naturalmente, *Helicoverpa* spp. e *H. virescens* são mais tolerantes que outras espécies à maioria dos inseticidas requerendo altas doses para controle efetivo (BUENO; SOSA-GOMEZ, 2014). Segundo o Banco de Dados de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (Arthropod Pesticide Resistance Database), iniciativa entre o Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas (Insecticide Resistance Action Committee - IRAC) e Universidade do Estado de Michigan, há relatos de 856 casos de resistência de *H. armigera* a diversos grupos de inseticidas e toxinas Bt (Arthropod Pesticide Resistance Database, 2019). Inclusive há o relato de resistência *H. armigera* a piretróides no Brasil (DURIGAN et al., 2017).

Considerando os casos de resistência de *H. armigera* aos principais mecanismos de controle utilizados é visível a necessidade do desenvolvimento de estratégias de controle. Estas estratégias devem ser baseadas nas práticas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (BUENO; SOSA-GOMEZ, 2014; POMARI-FERNANDES et al., 2015) e no âmbito da biotecnologia e transformação genética de plantas envolvem o manejo adequado da resistência à tecnologia Bt atualmente em uso, além da rotação de genes de resistência a insetos e o empilhamento gênico. Estas técnicas são consideradas estratégias promissoras para retardar o aparecimento de insetos resistentes (AVILLA et al., 2005; GUJAR et al., 2007).

Considerando a busca por novos genes que possam ser utilizados para o controle de *H. armigera* e outros insetos praga alvo podemos citar o uso do mecanismo de RNA de interferência (RNAi) e a utilização da proteína recombinante com propriedades entomotóxicas Jaburetox.

2.2 RNA de interferência

O RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo de silenciamento gênico a nível pós transcricional, ou seja, ocorre a nível de RNA mensageiro (RNAm) e é desencadeado pela ligação de pequenos RNAs, com aproximadamente 21-25 nucleotídeos, com RNAsm com os quais apresentam complementariedade de pares de base (DING, 2010; NANDETY et al., 2015). Este mecanismo de silenciamento gênico é altamente conservado em eucariotos e possui importante função na regulação gênica, defesa do organismo contra elementos de transposição e, em plantas e insetos, este mecanismo também está envolvido na resposta 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.). Na tentativa de super expressar o gene *chalcone sintase (chs)* a fim de aumentar a síntese de antocianinas foi observado a redução ou ausência do pigmento devido ao silenciamento do transgene e do gene endógeno, fenômeno conhecido como co-supressão (NAPOLI et al., 1990).

Posteriormente, foi verificado o silenciamento do gene *par-1* no nematoide *Caenorhabditis elegans* Maupas (Rhabditida: Rhabditidae) pela introdução da fita de RNA antissenso (GUO; KEMPHEUS, 1995). 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.

O mecanismo de RNAi que resulta no silenciamento de genes pode ser dividido em três etapas principais: i) clivagem das moléculas de RNAdf em fragmentos menores pela enzima Dicer; ii) ligação destes fragmentos 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; KATOCH; THAKUR, 2013).

A enzima DICER (ou ribonuclease III-Dicer-2) é uma endonuclease específica de RNAdf, que, na presença de ATP, cliva o RNAdf em fragmentos menores de ~ 21-25 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* (hpRNA) 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).

Após a clivagem em fragmentos menores uma das fitas do siRNA que é conhecida como fita guia, que tem a função de localização e ligação com o RNAm alvo, é carregada no RISC o qual contém a proteína Argonauta, com seu componente catalítico, responsável pela degradação do RNAm alvo. Durante o carregamento da fita guia, a fita não-guia do siRNA é clivada e ejetado do complexo. O complexo RISC, guiado pela fita-guia encontra o RNAm alvo e media a clivagem ou inibição da tradução (ROETHER; MEISTER, 2011; BURAND; HUNTER 2013; SCOTT et al., 2013).

Em microorganismos eucariotos, fungos, plantas, nematoides e no cefalocordado *Branchiostoma floridae* Hubbs (Amphioxiformes: Branchiostomidae) foi identificada a presença da enzima RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase – RdRp*) que 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).

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 (WHANGBO; HUNTER, 2008; LIM et al., 2016).

Desde seu descobrimento o mecanismo de RNAi tem sido amplamente utilizado para estudos de função e regulação gênica, para conhecimento do funcionamento do próprio mecanismo e, mais recentemente, tem sido avaliado seu potencial de utilização em áreas da medicina, no tratamento de doenças (RAHMAN et al., 2008) e na agricultura no controle de pragas e alterações de características de plantas como a melhoria de qualidade nutricional (PRICE; GATEHOUSE, 2008; HUVVENE; SMAGHE, 2010; KATOCH; THAKUR, 2013).

Considerando a aplicação na agricultura, o mecanismo de RNAi pode ser utilizado para melhoria da qualidade nutricional e redução de antinutrientes e toxinas, macho esterilidade, biorremediação, alteração de coloração de flores, resistência a doenças virais, bacterianas, fúngicas e a nematoides (KATOCH; THAKUR, 2013) e como estratégia para o controle de insetos-praga (PRICE; GATEHOUSE, 2008; HUVVENE; SMAGHE, 2010; KATOCH; THAKUR, 2013).

O RNAi pode ser utilizado para controle de insetos-praga pela supressão de genes essenciais à sobrevivência levando à mortalidade e/ou efeitos subletais (SCOTT et al., 2013). Inicialmente, a utilização do silenciamento gênico nos insetos alvo por RNAi como método de controle foi considerado inviável. Fatores como a ausência da enzima RdRp limitando o efeito do silenciamento e demandando altas doses de RNAdf

disponibilizadas continuamente foram considerados dificuldades significativas na aplicação desta tecnologia (PRICE; GATEHOUSE, 2008).

No entanto, após diversos estudos com a utilização do mecanismo de RNAi em insetos, foi verificado que os principais fatores que interferem na eficiência do silenciamento estão relacionados com a escolha do gene alvo do silenciamento e o método de disponibilização das moléculas desencadeadoras do processo de silenciamento via RNAi (ZHANG et al., 2013; XU et al., 2016).

A utilização da técnica de microinjeção de RNAi ou siRNA diretamente no corpo do inseto exclui as dificuldades de captação do RNAi pela célula. Dessa forma, o funcionamento do mecanismo de silenciamento por RNAi depende exclusivamente da existência da maquinaria core do RNAi (TERENIUS et al., 2011; BURAND; HUNTER 2013), 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 microinjeção apresentar melhores resultados de silenciamento, um dos problemas da técnica é a ocorrência de danos mecânicos que podem ocorrer durante o processo. Além disso, essa técnica não é aplicável a campo para controle de insetos-praga (BURAND; HUNTER, 2013). Neste sentido, uma das técnicas menos invasivas e possíveis de aplicação a campo é a disponibilização via oral das moléculas desencadeadoras do processo de silenciamento gênico (SCOTT et al., 2013) obtendo-se resultados promissores (revisado por TERENIUS et al., 2011; revisado por LIM et al., 2016, revisado por XU et al., 2016).

Os trabalhos desenvolvidos por Mao et al. (2007) e Baum et al. (2007) foram os primeiros a fornecer evidências do potencial de utilização do mecanismo de RNAi para controle de insetos-praga e demonstrar que é possível silenciar genes em insetos pelo consumo de plantas geneticamente modificadas contendo construções para expressão de hpRNAs dos genes alvo de silenciamento (BAUM et al., 2007; MAO et al., 2007; HUVENNE; SMAGGHE, 2010).

Atualmente encontra-se disponível no mercado um evento 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*. Este evento foi liberado comercialmente no Brasil em 2016 (ISAAA, 2019a).

Para a utilização do mecanismo de RNAi como método de controle de insetos-praga via disponibilização oral o foco do estudo é relacionado ao RNAi ambiental (WHANGBO; HUNTER, 2008), que envolve a captura do RNAdf/siRNA pelo lúmen do intestino do inseto, e, o RNAi sistêmico, que possibilita o silenciamento de genes expressos em outros tecidos e envolvidos em funções não relacionadas ao sistema digestório (KUMAR et al., 2009; ASOKAN et al., 2014; MAMTA et al., 2016).

São propostos dois mecanismos de captação de RNAdf/siRNA pelas células: i) captação mediada por canais transmembrana envolvendo as proteínas SID-1 e SID-2 (JOSE et al., 2007), e ii) captação mediada por endocitose (SALEH et al., 2006).

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 alimentação com plantas geneticamente modificadas contendo construções para a expressão de moléculas indutoras do silenciamento, a utilização de bactérias geneticamente transformadas expressando o RNAdf do gene alvo incorporadas na dieta ou ainda a utilização destas bactérias para a produção e isolamento de RNAdf para ser utilizado nos experimentos (KUMAR et al., 2009; YANG; HAN, 2014; ASOKAN et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

Insetos não possuem a enzima RdRp que facilitaria o processo de RNAi sistêmico, mas podem utilizar outros mecanismos que possibilitem a propagação do sinal de silenciamento para outras células (KUMAR et al., 2009; ASOKAN et al., 2013; ASOKAN et al., 2014; MAMTA et al., 2016; YANG; HAN, 2014; LIM et al., 2016). Porém, neste caso é necessário que a alimentação com as moléculas indutoras do

silenciamento seja contínua para que os resultados de RNAi sistêmico sejam efetivamente observados (ZHANG et al., 2013; LIM et al., 2016).

Além disso, quando se avalia a resposta ao RNAi em insetos a sensibilidade ao mecanismo de silenciamento varia consideravelmente entre diferentes espécies. Enquanto algumas espécies apresentam uma resposta robusta de silenciamento outras, especialmente insetos da ordem Diptera e Lepidoptera, em geral, apresentam aspectos mais recalcitrantes ao mecanismo (GU; KNIPPLE, 2013, TERENIUS et al., 2011).

A resposta ao mecanismo de RNAi em Lepidopteros apresenta grande variação, inclusive em estudos utilizando microinjeção (revisado por TERENIUS et al., 2011). Em geral, para a obtenção de bons resultados de silenciamento e verificação de altas taxas de mortalidade e efeitos subletais em insetos desta ordem é necessário a disponibilização contínua e em altas doses de RNAdf/siRNA (TERENIUS et al., 2011, LIM et al., 2016).

Uma das alternativas mais atrativas que possibilita a disponibilização contínua das moléculas indutoras do silenciamento é a utilização de plantas geneticamente modificadas capazes de induzir o silenciamento gênico por RNAi no inseto-praga alvo. Neste sistema é inserido na planta, via transformação genética, construções contendo as sequências senso e antissenso de parte do gene alvo do silenciamento. Quando transcrita, essa construção forma uma estrutura de grampo de RNA (*hairpin RNA* – hpRNA) que é funcionalmente equivalente ao RNAdf (GU; KNIPPLE, 2013). Esta estratégia tem se mostrado eficiente para o silenciamento e controle de insetos praga alvo de diferentes ordens (MAO et al., 2007; MAO et al., 2011; BAUM et al., 2007; PITINO et al., 2011; MAMTA et al., 2016; HAN et al., 2017).

Além disso, a expressão de hpRNAs pelas plantas transgênicas é considerado eficiente pois as moléculas ficam dentro da célula (TERENIUS et al., 2011) e, dessa forma, menos suscetível a degradação pela ação de enzimas presentes no sistema digestório dos insetos apresentando melhores resultados de silenciamento gênico, especialmente em espécies mais recalcitrantes ao mecanismo de RNAi.

A variação na efetividade das moléculas de RNAdf em ocasionar o silenciamento de genes em insetos não depende somente da sensibilidade do inseto ao mecanismo, mas também é altamente influenciado pela escolha do gene a ser silenciado (GU; KNIPLE, 2013). O silenciamento de determinados genes de insetos pode afetar o crescimento, o desenvolvimento e causar mortalidade. A maioria dos estudos tem focado em órgãos e tecidos do sistema digestório dos insetos (ZHANG et al., 2013)

O corpo do inseto é coberto por um exoesqueleto de quitina e, na maioria dos insetos, somente o intestino é revestido pela membrana peritrófica, dessa forma, genes do sistema digestório foram considerados melhores alvo de silenciamento por RNAi. Além disso, as células do intestino médio são responsáveis pela absorção de nutrientes do lúmen intestinal, sendo assim, consideradas o principal canal de absorção das moléculas indutoras do silenciamento (ZHANG et al., 2013).

Para *H. armigera* 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 (*Nicotiana tabacum* L.) 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; SAINI et al., 2018), ou então estão expressos em todo o organismo, como os genes *transferrina*, *quitinase*, *arginina quinase* e *ATPase vacuolar* (XIONG et al., 2013; ASOKAN et al., 2014; YANG; HAN, 2014; AGRAWAL et al., 2015; LIU et al., 2015; MAO et al., 2015; ZHANG et al., 2015; HAN et al., 2017). Os principais resultados obtidos através da administração oral

de hpRNA/RNAdf/siRNA estão relacionados à mortalidade, redução do consumo, inibição do crescimento, má-formação e redução da fecundidade, estes efeitos 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.

Conforme anteriormente mencionado, 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. 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).

O potencial de utilização deste gene como alvo de silenciamento já foi demonstrado para *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (GONG et al., 2011), 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, e para *H. armigera* via alimentação com moléculas de RNAdf sintetizadas *in vitro* e disponibilizadas sobre discos foliares de soja (CECCON, 2016).

A disponibilização via oral de moléculas de RNAdf complementares a parte do gene *rieske* de *H. armigera* às larvas desta espécie causou redução da expressão do gene, mortalidade e efeitos subletais nos insetos (CECCON, 2016). Porém, como em muitos

casos de trabalhos com *H. armigera* e outros lepidópteros (TERENIUS et al., 2011; LIM et al., 2016), foi verificado a natureza transiente do silenciamento do gene *rieske* em *H. armigera*, demandando a alimentação contínua para obtenção de melhores resultados.

A proteção de plantas mediada por RNAi tem sido considerada uma potencial tecnologia de nova geração para o controle de insetos praga (PRICE; GATEHOUSE, 2008; HUVENNE; SMAGHE, 2010; ZHANG et al., 2013). Os experimentos realizados até o momento têm demonstrado que o RNAi em insetos é um mecanismo de *knockdown* e não *knockout*, ou seja, não ocorre o silenciamento total e, em caso de alimentação descontínua, o efeito é transiente (SHAKESBY et al., 2009). Dessa forma, em alguns casos é necessário o aumento da eficácia de proteção (ZHANG et al., 2013) que pode ser obtido pelo empilhamento gênico, seja utilizando o mecanismo de RNAi para silenciamento de múltiplos genes ou a associação do mecanismo de RNAi e outro mecanismo que afete a sobrevivência e o desenvolvimento do inseto-praga alvo.

2.3 Jaburetox

Ureases (EC 3.5.1.5 amidohidrolases de uréia) são enzimas que catalisam a reação de hidrólise de uréia em amônia e dióxido de carbono (WANG; TARR, 1955; DIXON et al., 1975). Estas enzimas foram isoladas de uma variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos e plantas (FOLMER, 2008). Dentre as ureases de plantas, a isolada de sementes de *Canavalia ensiformis* (L.) DC foi a primeira enzima a ser cristalizada comprovando que enzimas são proteínas, representando um marco no estudo de enzimas (SUMNER, 1926).

Em plantas, as ureases contribuem para a biodisponibilidade de nitrogênio e em mecanismo de defesa das plantas (POLACCO; HOLLAND, 1993; CARLINI; POLACCO, 2008). As ureases representam um grupo de proteínas vegetais com potencial de uso devido a suas propriedades inseticidas, fungicidas e bactericidas (BECKER-RITT et al., 2017).

As sementes de *C. ensiformes* apresentam três isoformas de urease: *Jackbean* urease (JBURE-I) (SUMNER, 1926), canatoxina (CNTX) (CARLINI; GUIMARÃES, 1981) e JBURE-II (PIRES-ALVES et al., 2003). A CNTX foi isolada de *C. ensiformes* em 1981 (CARLINI; GUIMARÃES, 1981) e inicialmente foi caracterizada como uma proteína neurotóxica por induzir convulsões em ratos quando injetada (CARLINI et al., 1984). Após 20 anos, a CNTX foi caracterizada como uma isoforma de urease (FOLMER et al., 2001), com propriedades entomotóxicas (CARLINI et al., 1997).

Estudos posteriores demonstraram que a toxicidade da CNTX a insetos é decorrente de um polipeptídio interno de 10 kDa denominado *pepcanatox* liberado da proteína pela hidrólise por enzimas digestivas do tipo catepsinas (CARLINI et al., 1997; FERREIRA DA SILVA et al., 2000; STANISCUASKI et al., 2005; DEFFERRARI et al., 2011). Dessa forma, apenas insetos que possuem enzimas digestivas do tipo catepsina, como *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae), são suscetíveis a CNTX. Já os insetos com enzimas digestivas do tipo tripsinas, como *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae) e *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae), não eram suscetíveis (STANISCUASKI; CARLINI, 2012)

Baseado na sequência N-terminal do *pepcanatox* e utilizando como template o cDNA da isoforma de urease JBURE-II foi produzido o polipeptídeo Jaburetox-2Ec (JBTX-2Ec) de forma heteróloga em *Escherichia coli* (Escherich) (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae) (MULINARI et al., 2007). Este peptídeo possui 93 aminoácidos e, em virtude do vetor plasmidial (pET 101/D-TOPO), possui o epítipo V5 com 18 aminoácidos e cauda com seis histidinas (MULINARI et al., 2007).

Os peptídeos recombinantes Jaburetox-2Ec e Jaburetox (JBTX), que diferem entre si pela ausência do epítipo V5 no JBTX, demonstraram potente efeito contra insetos, bactérias e fungos (MULINARI et al., 2007; POSTAL et al., 2012). No caso de insetos, os peptídeos recombinantes afetaram também insetos com enzimas digestivas do tipo tripsina como o lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (MULINARI et al., 2007).

Análises moleculares do JBTX demonstraram a existência de uma sequência que poderia adotar uma conformação de β -*hairpin* na região C-terminal. Esta estrutura é semelhante a encontrada em outros peptídeos antimicrobianos com propriedades de ruptura de membrana (MULINARI et al., 2007; BECKER-RITT et al., 2017). Para verificação da importância desta estrutura nas atividades biológicas do JBTX foram avaliados três mutantes do JBTX denominados: i) jaburetox N-terminal (JBTX N-ter) correspondente aos resíduos 1 a 44; ii) jaburetox C-terminal (JBTX C-ter) correspondente aos resíduos 45 a 93, e; iii) jaburetox- $\Delta\beta$ (JBTX- $\Delta\beta$) sem os aminoácidos 61 a 74. Os resultados sugerem que a região β -*hairpin* não é importante para a entomotoxicidade e que a porção N-terminal de JBTX é responsável pela atividade entomotóxica. Porém, a região C-terminal, que contém o β -*hairpin* pode contribuir significativamente com a capacidade do JBTX interagir com a bicamada lipídica (MARTINELLI et al., 2014; BECKER-RITT et al., 2017).

O mecanismo de ação inseticida das ureases JBURE-I, CNTX e JBURE-II não está completamente elucidado. Estudos em *R. prolixus* demonstraram que JBURE-I e o JBTX inibem a secreção nos túbulos de Malpighi, comprovando o efeito antidiurético. Além disso, foi verificado que o efeito antidiurético induzido pela urease de *C. ensiformes* envolve eicosanoides e canais de cálcio enquanto o JBTX age alterando os níveis de GMP cíclico e o potencial transmembrana dos túbulos de Malpighi (STANISCUASKI et al., 2009). Utilizando o hemíptero *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae) como inseto modelo, foi demonstrado que a injeção de JBTX em adultos causou efeitos neurotóxicos, que incluíam comportamento anormal das antenas e movimentos descoordenados das pernas, seguido da morte de todos os insetos. O JBTX foi encontrado ligado a células neurais e interferindo de diferentes formas em pelo menos duas enzimas no cérebro do inseto: i) inibindo a atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) reduzindo os níveis do neurotransmissor óxido nítrico, e; ii) aumentando a atividade da enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase (UAP), envolvida nas rotas de glicosilação e síntese de quitina (GALVANI et al., 2015). Além de interferir na diurese e causar efeitos relacionados ao sistema nervoso central, o JBTX interfere na resposta

imune de *R. prolixus*, afetando a capacidade do inseto de efetivamente neutralizar a infecção bacteriana (FRUTTERO et al., 2016).

O peptídeo entomotóxico JBTX tem potencial para ser utilizado para controle de vetores de doenças e insetos-praga na agricultura (BECKER-RITT et al., 2017). *T. infestans* e *R. prolixus*, vetores da doença de Chagas já foram amplamente utilizados como insetos modelos em estudos da toxicidade da urease de *C. ensiformis* e do peptídeo recombinante derivado JBTX. Os resultados destes estudos demonstraram efeitos de mortalidade e atraso no desenvolvimento dos insetos devido, de acordo com os resultados de experimentos, à atividade da entomotoxina nos túbulos de Malpighi, sistema nervoso central e na resposta imune (revisado por CARLINI; LINGABUE-BRAUN, 2016). Outro inseto que tem sido foco de grandes esforços para controle é o mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae) vetor de doenças como febre amarela, dengue, Chikungunya e Zika vírus (ZARA et al., 2016). O JBTX foi testado como possível estratégia de controle deste inseto e os resultados obtidos demonstraram o potencial entomotóxico do JBTX no controle de *A. aegypti* devido a interferência no ciclo biológico gerando alta mortalidade tanto de larvas quanto de adultos (KAPPAUN et al., 2011).

Considerando insetos-praga de importância agrônômica, foi verificado a efetividade da proteína purificada JBTX disponibilizado via oral à *S. frugiperda* (MULINARI et al., 2007), *Dysdercus peruvianus* Guérin-Méneville (Heteroptera: Pyrrhocoridae) (MULINARI et al., 2007; MARTINELLI et al., 2014) e *H. armigera* (DIDONÉ et al., em preparação) sendo observada mortalidade, atraso no desenvolvimento e redução do consumo das larvas alimentadas com JBTX.

Estudos preliminares de biossegurança demonstraram que altas doses do JBTX são inócuas a mamíferos modelos, tanto quando administrados via oral quanto via injeção (MULINARI et al., 2007). Estes resultados encorajaram estudos para o desenvolvimento uma nova tecnologia de controle de insetos via utilização de plantas geneticamente modificadas expressando o peptídeo JBTX (BECKER-RITT et al., 2017). Em trabalho realizado com *S. frugiperda* utilizando plantas de tabaco expressando o JBTX, foi verificado a mortalidade das larvas, chegando a 100% em algumas plantas após 15 dias

(MULINARI, 2008). Em estudos preliminares utilizando plantas de cana-de-açúcar expressando o JBTX foi verificada alta mortalidade nos lepidópteros *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) e *Telchin licus licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae) (BECKER-RITT et al., 2017). Avaliando plantas de soja transgênicas contendo o JBTX quanto ao seu potencial de controle de *H. armigera* foi verificado que algumas plantas causaram alta mortalidade das larvas, chegando a 91% (dados não publicados). Plantas de milho geneticamente modificadas contendo JBTX tiveram efeito sobre *S. frugiperda*, reduzindo o consumo, o ganho de peso, ocasionando mortalidade e interferindo no potencial reprodutivo dos adultos (DIDONÉ, 2018).

Considerando as principais estratégias de controle utilizadas atualmente e os casos de resistência a inseticidas químicos e biológicos reportados para várias espécies de insetos-praga (Arthropod Pesticide Resistance Database, 2019), é visível a necessidade da realização de estudos e a busca por novas estratégias que possam ser utilizadas no controle de insetos. Considerando o potencial entomotóxico do peptídeo JBTX e os resultados preliminares indicando a inocuidade para mamíferos, este peptídeo é um bom candidato para desenvolvimento de novas tecnologias para controle de insetos-praga.

2.4 Empilhamento gênico

De modo geral, empilhamento gênico se refere ao processo de combinação de dois ou mais genes de interesse no genoma de uma única planta gerando a expressão de uma ou mais características de interesse agrônomo (ISAAA, 2017). As plantas geneticamente modificadas com empilhamento gênico, especialmente considerando as maiores culturas, geralmente apresentam somente alguns genes e características, geralmente relacionados a tolerância a herbicidas e resistência a insetos conferida pelos genes *Cry* (ISAAA, 2019b).

A maior parte dos eventos transgênicos resistentes a insetos aprovados comercialmente foram obtidos pela inserção de genes *Cry* oriundos da bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis*. Estas plantas são comumente conhecidas como plantas Bt. As proteínas CRY são δ -endotoxinas que após sua ativação formam peptídeos

que se ligam as microvilosidades do intestino médio dos insetos, causando a formação de poros e conseqüentemente lise das células e morte do inseto (SCHNEPF et al., 1998).

A primeira geração de plantas Bt expressavam somente uma toxina. Porém, devido ao surgimento de casos de resistência e devido a demanda por plantas resistentes a uma maior gama de insetos, as plantas de segunda geração apresentam empilhamento gênico. Aquelas que expressam mais de uma proteína CRY tendo como alvo a mesma espécie de inseto são importantes ferramentas para retardar o aparecimento de resistência a tecnologia Bt, seguindo a estratégia de ataque múltiplo (ZHAO et al., 2005).

Porém, pode ocorrer resistência cruzada e antagonismo entre as proteínas Bt (revisado por FERRÉ; VAN RIE, 2002; CARRIÈRE et al., 2015) reduzindo a eficiência de controle e a durabilidade da tecnologia. Dessa forma, são necessárias novas táticas de manejo, como por exemplo a utilização de novas substâncias inseticidas expressas em plantas transgênicas que possam ser utilizadas em conjunto ou como alternativa aos genes *Cry*.

Ni et al. (2017) testaram o empilhamento entre genes *Cry* e RNAi, via cruzamento entre plantas de algodão da variedade GK19 expressando o gene *CryIAc/CryIAb* e plantas geneticamente modificadas em que foram introduzidas construções para a expressão do hpRNA dos genes *JHAMT*, envolvido na síntese de hormônio juvenil, e *JHBP*, que transporta o hormônio juvenil para os órgãos, ambos complementares aos genes de *H. armigera*. A análise dos bioensaios demonstrou a efetividade das plantas empilhadas em controlar *H. armigera*.

Cultivares com duas ou mais substâncias inseticidas podem aumentar a eficiência de controle, pois os insetos resistentes a uma toxina podem ser controlados pela outra toxina (CROWDER; CARRIÈRE 2009). A eficiência das plantas empilhadas expressando mais de uma substância inseticida é dependente, especialmente, da baixa frequência inicial de indivíduos resistentes a ambas substâncias inseticidas, retardando assim, a evolução da resistência (FERRÉ; VAN RIE, 2002).

Além disso, devem ser observadas algumas condições que favorecem a durabilidade do empilhamento de genes *Cry*: a) presença de áreas de refúgio suficientes; b) baixa frequência de alelos conferindo resistência a cada toxina; c) resistência recessiva a cada toxina; d) custo adaptativo e resistência incompleta associado a resistência a cada toxina; e) plantas com empilhamento não são cultivadas concomitantemente com plantas produzindo uma das toxinas isoladamente; f) cada toxina mata todos ou praticamente todos os indivíduos suscetíveis; g) não ocorra resistência cruzada; h) alta taxa de mortalidade redundante, ou seja, a capacidade de uma toxina matar os insetos resistentes a outra toxina (CARRIÈRE et al., 2015). Apesar destas informações serem relacionadas ao empilhamento de toxinas Bt, estas condições podem ser aplicadas à piramidação de genes que codificam para quaisquer outras substâncias inseticidas.

Há diferentes formas de obtenção de plantas com empilhamento gênico. As táticas utilizadas podem ser separadas em dois grupos principais: i) métodos de introdução simultânea, e; ii) métodos de introdução sequencial.

Os métodos de introdução simultânea se referem a introdução de vários genes no mesmo processo de transformação genética. Esta técnica é descrita como co-transformação e pode ser separada em dois subgrupos de acordo com a metodologia utilizada. Quando todos os genes estão presentes no mesmo plasmídeo é denominada “co-transformação com único plasmídeo” e quando os genes estão em plasmídeos separados é denominada “co-transformação com múltiplos plasmídeos” (FRANÇOIS et al., 2002).

Já a introdução sequencial dos genes pode ser realizada pelos processos de re-transformação ou pelo cruzamento entre dois ou mais eventos transgênicos. A re-transformação envolve a transformação de uma planta já transgênica para inserção de uma nova característica. Considerando os métodos de transformação sequencial, a re-transformação possui a vantagem de que o empilhamento de transgenes independe do cruzamento sexual entre as plantas doadoras. Dessa forma, utilizando esta metodologia é possível a combinação de características em plantas que possuem propagação vegetativa ou dificuldades na realização de cruzamento entre eventos transgênicos (FRANÇOIS et al., 2002).

O método utilizado para a obtenção do empilhamento gênico via cruzamento é tecnicamente simples, pois envolve somente a transferência do pólen de um dos parentais para o órgão reprodutivo feminino do outro. Porém não pode ser utilizado em plantas com propagação vegetativa (FRANÇOIS et al., 2002). A utilização de métodos tradicionais de melhoramento para combinação de eventos contendo um ou mais genes expressando características de interesse é uma das maneiras mais rápidas e fáceis de obtenção de plantas com empilhamento gênico (ISAAA, 2017, QUE et al., 2010). A maioria dos eventos com empilhamento duplo, triplo ou quadruplo, são resultantes do cruzamento entre parentais transgênicos (ISAAA, 2019b). Uma das principais vantagens deste método é a flexibilidade na escolha dos genes e características a serem introduzidas na planta (QUE et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Laboratório de Entomologia da Universidade de Passo Fundo e no *United States Horticultural Research Laboratory* do *United States Department of Agriculture* (USDA) em Fort Pierce, Flórida-USA.

3.1 Construções gênicas

Um vetor plasmidial foi construído contendo a sequências senso e antissenso de parte do gene *rieske* de *Helicoverpa armigera*, o gene alvo a ser silenciado, visando a produção de um RNA fita simples auto complementar que forma a estrutura de grampo de RNA (*hairpin* RNA - hpRNA). A figura 1A mostra a sequência do cDNA do gene *rieske* de *H. armigera*, o qual faz parte do complexo do citocromo bc-1 da mitocôndria. A região dupla fita apresenta a mesma sequência da região do RNAm do gene *rieske* (número de acesso NCBI: XM_021342124.1), alvo do silenciamento (Figura 1B). A região selecionada para construção do RNAdf apresenta sequência mais específica à *H. armigera*, enquanto a porção terminal do gene é mais conservada em diferentes espécies, fator que poderia ocasionar problemas com *off targets*, ou seja, poderia afetar insetos que não são alvos.

Da mesma forma foi engenheirado um plasmídeo contendo a sequência gênica que codifica para a expressão do gene *jaburetox*, que codifica o peptídeo entomotóxico recombinante Jaburetox (JBTX) (93 aminoácidos). As sequências senso (S1) e antissenso (S2) complementares a parte do gene *rieske* de *H. armigera*, bem como a sequência gênica codificante da proteína entomotóxica JBTX (Tabela 1) foram sintetizadas pela empresa GeneScrip. Cada uma das construções foi clonada, separadamente, no plasmídeo de clonagem pUC57.

Figura 1 - Sequência do cDNA do gene *rieske* de *Helicoverpa armigera* com a sequência do RNAdf *rieske* em destaque (A) e pareamento da sequência de RNAdf *rieske* com parte do gene *rieske* de *H. armigera* (B).

Helicoverpa armigera cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial (LOC110381728), mRNA (NCBI Reference Sequence: XM_021342124.1)

```

1 tcaaacttga catttcttta atcgagcact tcgctcagcg aaaatatcaa agcaattttg
61 ttgcgtattht ctgctgtgat acaaaatgac ttcgggtcacg cgggctgggc atttggctcc
121 ttactttaaag gcaagttcat cgggtggtttc taatggcctg aagcctctgg ttgtcgcgca
181 tacaccagct gaaaagggtg ttggtgcaccc cttgccaana acctcgactg tggagtcact
241 gcatggatcc ctgcctatcc agggcttgaa ggccagagta aacggctcgc ggccaagcca
301 tgtacgtttc ggcataaccg acatcagcta ccccgacttc tcggcgtacc gtcgcaagga
361 gacgcaggat cccacctcaa gggctaacga caacgctgat ggacgtcagt ccttcaacta
421 tcttatcgct ggagccggtg gtgtggctgg agcgtacgcc gccaaagtcc ttggtgacgca
481 cttcgtgtcg tccatggcag ccgcagccga cgtcttgcc ttggccaaga ttgagatcaa
541 gctgtctgaa atcccggagg gcaagtctgt cactttcaag tggcgtggta agccactgtt
601 cattcgtcac agaaccgcaa acgagattag caccgagcag tcggtgccc tggaactct
661 tcgagaccg cagcacgaca accagcgcac acagaacccc aagtggctcg tcgtcatcgg
721 cgtgtgcacc cacctgggtt gcgtgcccgt cgccaacgcc ggcgacttcg gcggctacta
781 ctgcccctgc cacgggtccc actacgagc ctccggccgc atccgcaagg gcccccccc
841 cctcaacctc gaagtacccc cccacagctt cgtcgaagag ggcctcctag ttgtaggcta
901 aacgacgta tttattagac aattttatta tataagtata ccgattcaga atcaataggc
961 gtcattctaat cttacaatca ataaatgta t //

```

A

RNAdf *rieske* *Helicoverpa armigera* *rieske* (RNAm, acesso: XM_021342124.1)

```

Query: 142 ggtggtttcctaagcctgaagcctctggttgcgcatacaccagctgaaaagggttt 201
Sbjct: 1 ggtggtttcctaagcctgaagcctctggttgcgcatacaccagctgaaaagggttt 60

Query: 202 ggtgcaccccttgccaanaacctcgactgtggagtcactgcatggatccctgcctatcca 261
Sbjct: 61 ggtgcaccccttgccaanaacctcgactgtggagtcactgcatggatccctgcctatcca 120

Query: 262 gggcttgaaggccagagtaaacggtcgcggccaagccatgtacgtttcgcgataccga 321
Sbjct: 121 aggcttgaaggccagagtaaacggtcgcggccaagccatgtacgtttcgcgataccga 180

Query: 322 catcagctaccccgacttctcggcgtaccgtcgaaggagacgcaggatcccacctcaag 381
Sbjct: 181 catcagctaccccgacttctcggcgtaccgtcgaaggagacgcaggatcccacctcaag 240

Query: 382 ggctaacgacaacgtcgtatggacgtcagtccttcaactatcttatcgtggagccgggtgg 441
Sbjct: 241 ggctaacgacaatgctggtagcgtcagtccttcaactatcttatcgtggagccgggtgg 300

Query: 442 tgtggctggagcgtacgccccaagtccttggtagcgcacttc 484
Sbjct: 301 tgtggccggtagcgtacgccccaagtccttggtagcgcacttc 343

```

B

Tabela 1 - Sequência dos fragmentos S1 e S2 correspondentes as sequências senso e antisenso do gene *rieske* complementar ao cDNA do gene de *Helicoverpa armigera* e sequência gênica e proteica do *Jaburetox*

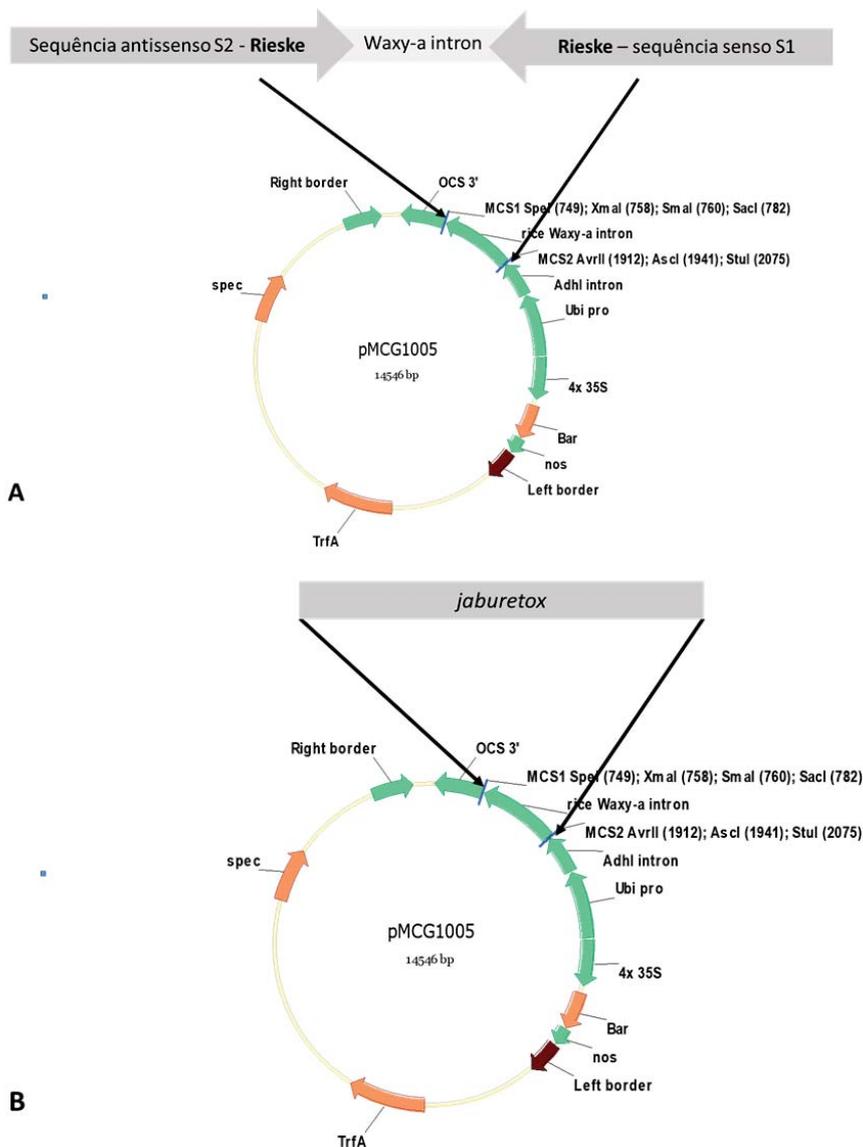
Fragmento	Sequência
S1	GGTGGTTTCTAATGGCCTGAAGCCTCTGGTTGTCGCGCATAACACCAG CTGAAAAGGTGTTGGTGCACCCCTTGCCAAAAACCTCGACTGTGGA GTCACTGCATGGATCCCTGCCTATCCAAGGCTTGAAGGCCAGAGTAA ACGGTCGCGGGCCAAGCCATGTACGTTTCGCGCATAACGACATCAG CTACCCCGACTTCTCGGCGTACCGTCGCAAGGAGACGCAGGATCCC ACCTCAAGGGCTAACGACAATGTCGGTGGACGTCAGTCCTTCACTTA TCTTATCGCTGGAGCCGGTGGTGTGGCCGGTGCGTACGCCGCCAAGT CCTTGGTGACGCACTTC
S2	GAAGTGCGTCACCAAGGACTTGGCGGCGTACGCACCGGCCACACCA CCGGCTCCAGCGATAAGATAAGTGAAGGACTGACGTCCACCGACAT TGTCGTTAGCCCTTGAGGTGGGATCCTGCGTCTCCTTGCAGCGGTAC GCCGAGAAGTCGGGGTAGCTGATGTCGGTATGCGCGAAACGTACAT GGCTTGGCCCGCGACCGTTTACTCTGGCCTTCAAGCCTTGGATAGGC AGGGATCCATGCAGTACTCCACAGTCGAGGTTTTTGGCAAGGGGT GCACCAACACCTTTTCAGCTGGTGTATGCGCGACAACCAGAGGCTTC AGGCCATTAGAAACCACC
<i>Jaburetox</i>	ATGGGTCCAGTTAATGAAGCCAATTGTAAAGCAGCTATGGAGATTG TGTGCAGAAGGGAATTTGGACATAAGGAAGAAGAAGATGCAAGTG AGGGTGTACCACAGGAGACCCTGATTGTCCTTTCACCAAAGCCATT CCTCGTGAAGAATATGCTAACAAGTATGGTCCGACTATTGGTGACAA AATCCGTCTTGGTGACACTGATTTGATTGCTGAAATTGAAAAGGATT TTGCCCTTTATGGTGATGAAAGTGTTTTTTGGAGGTGGAAAAGTTATA TAG
Jaburetox	M G P V N E A N C K A A M E I V C R R E F G H K E E E D A S E G V T T G D P D C P F T K A I P R E E Y A N K Y G P T I G D K I R L G D T D L I A E I E K D F A L Y G D E S V F G G G K V I Stop

Os plasmídeos foram clonados em *Escherichia coli* utilizando o Kit One Shot TOP 10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, USA). A seleção das bactérias transformadas foi realizada com 100 mg/L de ampicilina. A purificação dos plasmídeos foi realizada utilizando o Kit Wizard Plus SV Minipress DNA purification System (Promega, USA), conforme instruções do fabricante. A quantificação foi realizada com nanoespectrofotômetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, USA).

Para a expressão da hpRNA do gene *rieske* é necessário que as duas sequências, S1 e S2, estejam no mesmo plasmídeo separadas por uma sequência espaçadora de modo

que, após a transcrição, formem a estrutura de *hairpin*. Para isto, foi utilizado o plasmídeo binário pMCG1005 que contém dois sítios de restrição separados por uma sequência espaçadora em forma de íntron (*rice Waxy-a intron*). A sequência S1 foi desenhada para conter os sítios de restrição das enzimas *AscI* e *StuI* (sítio de multiclonagem 2 – MCS2) nas extremidades, enquanto a sequência S2 possui os sítios para as enzimas *SpeI* e *XmaI* (sítio de multiclonagem 1 – MCS1) (Figura 2A).

Figura 2 - Mapa do plasmídeo binário pMCG1005 sob controle do promotor *ubi-1* contendo o gene marcador *bar¹* sob controle do promotor 4X 35S e sítios de restrição separado pela sequência espaçadora, o íntron *Waxy-a*. Esquema do plasmídeo binário pMCG1005 com a inserção da construção *hairpin* RNA-*rieske* (A) e JBTX (B)



(1) Gene que confere resistência ao herbicida Bialaphos[®] e Glufosinato de amônio.

Para a inserção do gene *JBTX* no plasmídeo binário pMCG1005 (Figura 2B) a sequência do gene foi desenhada com os sítios de restrição para as enzimas *AvrII* e *XmaI*, resultando na substituição do íntron de arroz *Waxy-a* pela sequência do gene *JBTX*.

3.1.1 Construção pMCG1005/S1/S2

Os plasmídeos pMCG1005, pUC57/S1 e pUC57/S2 foram cortados com as enzimas específicas e tratados com a enzima Antarctic Phosphatase (New England BioLabs, EUA) para evitar o religamento do plasmídeo pMCG1005. As reações foram analisadas 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).

As sequências foram submetidas a reação de ligação no plasmídeo pMCG1005 utilizando a enzima Electro Ligase (New England BioLabs, EUA), seguindo instruções do fabricante. Posteriormente foi realizada a clonagem em *E. coli* utilizando o Kit One Shot TOP10 Electrocomp *E. coli* (Invitrogen, USA). As bactérias foram crescidas *overnight* em meio LB com 100 mg/L de espectinomicina para a seleção.

3.1.2 Construção pMCG1005/JBTX

Os plasmídeos pMCG1005 e pUC57/JBTX foram cortados com as enzimas *AvrII* e *XmaI*. O plasmídeo pMCG1005 foi tratado com a enzima Antarctic Phosphatase (New England BioLabs, EUA) para evitar a religação das extremidades. Os produtos da reação foram separados em gel de agarose 1% e purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR clean-up system Kit (Promega, EUA).

O fragmento *JBTX* foi inserido no plasmídeo pMCG1005 com a enzima Electro Ligase (New England BioLabs, EUA). Os plasmídeos foram clonados em *E. coli* utilizando o Kit One Shot TOP10 Electrocomp *E. coli* (Invitrogen, USA). As bactérias foram crescidas *overnight* em meio LB com 100 mg/L de espectinomicina para a seleção. Das colônias obtidas para ambas construções foi realizado qPCR para verificação da presença dos genes.

3.1.3 PCR

Foi utilizado o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação de 50 µl foram utilizados 25 µl de GoTaq qPCR Master Mix, 1 µl de cada um dos *primers*, *forward* e *reverse* (Tabela 2), na concentração de 10 µM/µl e 23 µl de *nuclease free water*. Uma pequena quantidade de cada colônia foi adicionada na reação de qPCR. As condições de termociclagem foram: 95 °C por 5 min., seguido de 40 ciclos de 95 °C por 1 min., 52 °C por 1,5 min. e 72 °C por 1 min., seguido da extensão final a 72 °C por 5 min. Para análise dos produtos do qPCR foi realizada a análise da curva de dissociação (curva de Melting) de 65 °C à 95 °C.

Os *primers* utilizados para amplificação das sequências S1 e S2 foram desenhados nas regiões do plasmídeo pMCG1005 adjacentes aos locais de inserção dos fragmentos. No caso da construção pMCG1005/*JBTX* foram utilizados *primers* específicos para amplificação do gene *JBTX* (Tabela 2).

Tabela 2 - Pares de *primers* utilizados nas análises moleculares de vetores, plantas e insetos

Nome do primer	Sequência	Amplicon (pb)	TM (°C)
PCR convencional – vetor			
Ha_S1_Vector	F: 5' AAAACGAGCAATGAAAGATGC 3' R: 5' CCCTGTTTCTCGGACGTAAG 3'	607	52
Ha_S2_Vector	F: 5' ATTAAGCAGGACTCTAGACCC 3' R: 5' AATTCAGTGGAGCTCAGAGC 3'	409	52
JBTX (MULINARI et al., 2007)	F: 5' CACCATGGGTCCAGTTAATG 3' R: 5' -ATAACTTTTCCACCTCC- 3'	279	54
PCR convencional – Análise plantas			
Ha_dsRNA_Plant	F: 5' TGTGGAGTCACTGCATGGAT 3' R: 5' TTGTCGTTAGCCCTTGAGGT 3'	164	56
JBTX (MULINARI et al., 2007)	F: 5' CACCATGGGTCCAGTTAATG 3' R: 5' -ATAACTTTTCCACCTCC- 3'	279	54
RT-qPCR – insetos			
Ha_rieske_out	F: 5' GGCTGGGTATTTGGCTCCTT 3' R: 5' AGCTGCCATGGACGACAC 3'	400	60
Ha_Ef1 α ¹	F: 5' CTGATTGTGGGCGTCAACAA 3' R: 5' TGCACGTTCCATCCCTTGAA 3'	209	60

(1) Gene de referência.

As colônias positivas foram crescidas em meio LB líquido com 100 mg/L de espectinomicina e os plasmídeos foram purificados utilizando o Kit Wizard Plus SV Minipress DNA purification System (Promega, USA), conforme instruções do fabricante.

Os plasmídeos pMCG1005/S1/S2 e pMCG1005/JBTX purificados foram inseridos via eletroporação em células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn (Rhizobiales: Rhizobiaceae), linhagem EHA 101. Para cada 40 µl de células eletrocompetentes foram adicionados 3 µl do plasmídeo na concentração de 15 ng/µl e submetidas a eletroporação. As bactérias foram crescidas em meio YEP contendo 50 mg/L de canamicina, para seleção das bactérias e, 100 mg/L de espectinomicina, para seleção do plasmídeo. As colônias obtidas foram submetidas novamente a PCR para verificação da amplificação dos fragmentos S1, S2 e JBTX e estocadas em glicerol 50% a -80 °C.

3.2 Transformação genética de tabaco (*Nicotiana tabacum*)

O protocolo de transformação de tabaco que foi seguido, juntamente com os meios utilizados é o comumente empregado no *Horticultural Research Laboratory*, USDA (Anexo I e II). As sementes de tabaco esterilizadas com solução de hipoclorito de sódio 1% foram germinadas em meio contendo ½ dos sais MS, 30g/L de sacarose e 6g/L de ágar. As plantas cultivadas neste meio foram doadoras de explantes segmentos foliares para transformação genética via *A. tumefaciens*.

As bactérias contendo os plasmídeos pMCG1005/S1/S2 e pMCG1005/JBTX foram coletadas do estoque de glicerol e crescidas *overnight* a 28 °C em meio YEP com os antibióticos 50 mg/l de canamicina e 100 mg/l de espectinomicina. Esta placa foi mantida refrigerada a 4 °C e utilizada para as transformações. No dia anterior à transformação, as bactérias foram crescidas *overnight* a 28 °C em meio YEP líquido com os antibióticos adequados. As bactérias foram precipitadas por centrifugação e ressuspensas em meio de infecção até atingir a OD₆₀₀ entre 0,6 e 1,0.

Segmentos foliares de aproximadamente 0,5 cm² obtidos das plantas cultivadas *in vitro* foram utilizados como explantes para a transformação genética. Os explantes foram mantidos em contato com a solução de *A. tumefaciens* por 5 minutos. Posteriormente os mesmos foram secos em papel filtro estéril para retirar o excesso de bactéria e transferidos para placas de petri contendo meio de cocultivo onde foram mantidas durante três dias, no escuro a 27 °C.

As transformações genéticas foram realizadas durante o mês de Setembro/2017 nos dias 02, 13, 15 e 19. Em cada data, cinco repetições foram realizadas para cada tratamento (pMCG1005/S1/S2 e pMCG1005/JBTX), sendo que cada repetição foi composta por uma placa de petri contendo cinco explantes. Duas placas controle cujos explantes não foram submetidos ao processo de transformação com a agrobactéria foram utilizados como controles. Uma das placas controle foi submetida ao processo de seleção com herbicida enquanto a outra não.

Após três dias de cocultivo, os explantes foram transferidos para o meio de seleção contendo o herbicida Bialaphos[®]. Os brotos que se desenvolveram no meio seletivo foram transferidos para o meio de enraizamento. Após a formação de raízes, as plantas foram transferidas para vasos com vermiculita e substrato Hortiplant[®] na proporção 50:50 e mantidas cobertas por sacos plásticos em câmara de crescimento sob condição de alta umidade, temperatura de 25 °C ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas. Aos poucos o plástico foi sendo retirado e as plantas foram transferidas para casa de vegetação com temperatura controlada de 25 °C ± 5 °C.

Após a transferência para a casa de vegetação quando as plantas atingiram de 10-20 cm foi realizado o *leaf painting assay*, para tal, foi demarcado uma região de 2 cm no sentido horizontal na parte mediana de uma folha no terço médio da planta e neste local foi aplicado solução do herbicida glufosinato de amônio a 1% para verificação da presença e expressão do gene marcador *bar*. As plantas positivas foram mantidas em casa de vegetação e no início do florescimento foram cobertas para evitar fecundação cruzada.

As sementes R1 de cada um dos eventos transgênicos foram coletadas separadamente e armazenadas a 4 °C até o momento da utilização.

3.3 Análises moleculares e bioensaios

3.3.1 Geração R1 de plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*)

As sementes R1, provenientes da autofecundação das plantas transgênicas de tabaco regeneradas *in vitro*, foram semeadas em floreiras com 50% substrato Hortiplant® e 50% vermiculita. Quando as plantas atingiram 10-12 cm foi realizado a pulverização com o herbicida glufosinato de amônio 1% para verificação da expressão do gene marcador *bar*. Das plantas *bar* positivas foi realizada a coleta de segmentos foliares para extração de DNA e análise de PCR para verificação da presença dos genes de interesse *hpRNA-rieske* e *JBTX* (*primers* descritos na Tabela 2).

O DNA foi extraído utilizando o método CTAB modificado pela adição de 0,2% de β -mercaptoetanol no tampão de extração. As amostras foram quantificadas em nanoespectrofotômetro NanoDrop™2000 (Thermo Scientific, EUA). O PCR foi realizado utilizando o Kit *Taq* DNA polymerase recombinat (Invitrogen, EUA) seguindo instruções do fabricante. Para a reação de 25 μ l foram adicionados 1,25 μ l de cada um dos *primers*, *forward* e *reverse* (Tabela 2), na concentração de 10 μ M/ μ l e 5 μ l de DNA na concentração de 50 ng/ μ l. As condições de termociclagem foram: 94 °C por 2 min., 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C e 54 °C por 45 s, para anelamento dos *primers rieske* e *JBTX*, respectivamente, 72 °C por 1 min. e extensão final a 72 °C por 5 min.

Das plantas positivas, quando possível, foram selecionadas duas plantas por evento para a realização de um pré-bioensaio para seleção das melhores plantas.

– **Pré-bioensaio da geração R1 de tabaco transgênico com *Helicoverpa armigera***

Foram selecionadas 61 plantas pertencentes a 32 eventos hpRNA-*rieske*, 64 plantas pertencentes a 36 eventos JBTX e três plantas não transformadas como controles negativo, totalizando 128 tratamentos. Cada tratamento consistia de duas placas de petri contendo um segmento foliar com cinco larvas de *H. armigera* em segundo ínstar. As larvas foram alimentadas com segmentos foliares das plantas geneticamente modificadas e a cada dois dias foi avaliada a mortalidade em cada um dos eventos. As larvas mortas foram retiradas das placas e a mortalidade acumulada foi contabilizada ao final do experimento. O experimento foi avaliado durante oito dias, ao final, foi realizada a pesagem das larvas e a estimativa de consumo total e de tamanho das larvas.

Os eventos em que houve maior taxa de mortalidade, somado ao menor peso, tamanho e consumo da área foliar foram selecionados para a realização o bioensaio com maior número de repetições e variáveis analisadas.

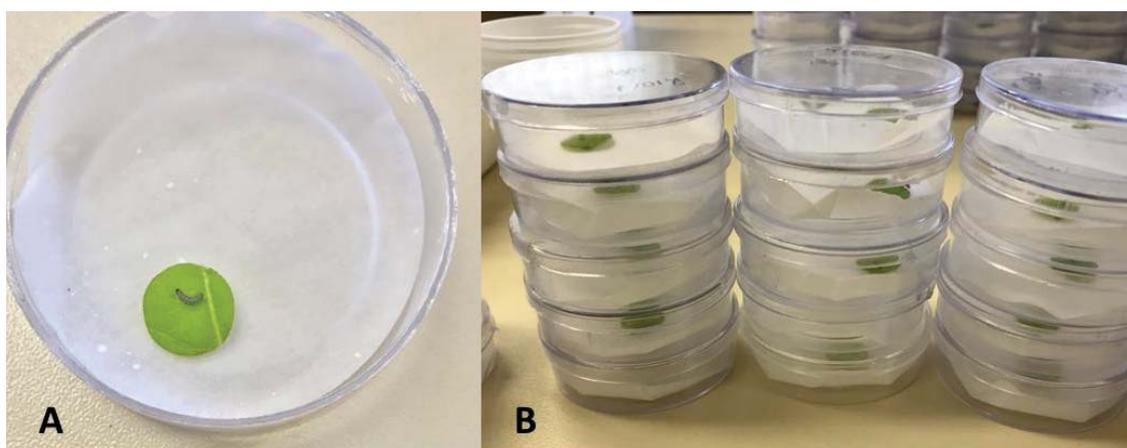
– **Bioensaio da geração R1 de tabaco transgênico com *Helicoverpa armigera***

Para a realização do bioensaio foram selecionadas oito plantas geneticamente modificadas contendo o gene para expressão do hpRNA-*rieske* pertencentes a sete eventos diferentes e oito plantas geneticamente modificadas contendo o gene *JBTX* pertencentes a oito eventos diferentes, além de duas plantas controle negativo.

Inicialmente foi realizado o bioensaio com as plantas hpRNA-*rieske* e posteriormente com as plantas JBTX. Cada um dos bioensaios foi constituído de dez tratamentos, oito plantas geneticamente modificadas e dois controles negativos. Cada tratamento foi composto de cinco repetições com de dez larvas de *H. armigera* em segundo estágio larval por repetição, totalizando 50 larvas por tratamento. As larvas foram individualizadas em placa de petri (5 cm de diâmetro) contendo papel umedecido e um disco foliar da planta transgênica a ser testada (Figura 3).

As larvas foram alimentadas com discos foliares de tamanho conhecido das plantas geneticamente transformadas e controle durante dez dias de desenvolvimento larval. Inicialmente foram disponibilizados discos foliares de 1 cm², conforme o crescimento e o aumento da necessidade alimentar das larvas foi aumentado a disponibilização de discos foliares chegando a 4 cm²/dia.

Figura 3 - Metodologia do bioensaio com larvas de *Helicoverpa armigera* de segundo ínstar. A) as larvas foram alimentadas com discos foliares de tamanho conhecido das plantas transgênicas e, B) foram mantidas individualizadas em placas de petri de 5 cm de diâmetro com papel filtro umedecido



Fonte: Fotos do autor

Diariamente foi avaliada a mortalidade e a troca do estágio larval, nos dias 3, 5, 7, 9 e 10 foi avaliado o consumo da área foliar e nos dias 4, 8 e 10 foi obtido o peso das larvas. Após o décimo dia de experimento as larvas foram transferidas para dieta artificial (modificada de GREENE et al., 1976) onde foram mantidas por aproximadamente 10 dias. Durante o período em que as larvas permaneceram em dieta foi avaliada a mortalidade das larvas. O delineamento experimental empregado foi o completamente casualizado. Os dados de mortalidade foram submetidos à transformação angular enquanto os dados de consumo e peso das larvas foram submetidos a transformação logarítmica. Foi realizada a análise de variância dos dados obtidos e as médias foram comparadas pelo teste Duncan a 5% de significância.

– **Expressão gênica das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com tabaco transgênico portador da construção hpRNA-*rieske***

Para verificação da eficiência do silenciamento gênico nas larvas alimentadas com as plantas geneticamente modificadas para expressão do hpRNA-*rieske* foi realizada a coleta do sistema digestório e dos tecidos do restante do corpo das larvas em terceiro estágio de desenvolvimento para análise da expressão do gene *rieske*. Dessa forma, no bioensaio utilizando as plantas hpRNA-*rieske* foram adicionadas 20 larvas por tratamento visando a coleta dos insetos para realização do RT-qPCR. Foram coletadas três replicatas biológicas para cada tratamento, cada uma contendo três larvas em terceiro ínstar.

O RNA foi extraído utilizando Trizol (Sigma-Aldrich, EUA), seguindo protocolo de Chomczynski & Mackey (1995). A quantificação e determinação da pureza das amostras foi realizada com nanoespectrofotômetro NanoDrop™2000 (Thermo Scientific, EUA) na absorvância de A₂₆₀ e A₂₈₀. 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), seguindo as instruções do fabricante.

O RT-qPCR foi realizado utilizando o *Kit* Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação de 20 µl, foi utilizado 0,5 µl de cada um dos *primers*, *foward e reverse* (Tabela 2) na concentração de 10 µM/µl e 2 µl de cDNA diluído a 5 ng/µl. 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 duplicatas técnicas e o gene *efl-α* foi utilizado como gene de referência. A expressão relativa do gene *rieske* foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e as médias comparadas pelo teste T.

3.3.2 Empilhamento gênico: cruzamento das plantas transgênicas hpRNA-*rieske* e *Jaburetox*

Foram selecionadas seis plantas transgênicas da geração R1 que apresentaram os melhores resultados nos bioensaios, três delas contendo a construção para a expressão do hpRNA-*rieske* e três contendo a construção para a expressão da proteína entomotóxica *JBTX*. Foi realizado a fecundação cruzada de todos os eventos englobando todas as combinações hpRNA-*rieske* x *JBTX* possíveis e os cruzamentos recíprocos *JBTX* x hpRNA-*rieske* (Tabela 3).

Tabela 3 - Cruzamentos entre os melhores eventos de tabaco transgênico hpRNA-*rieske* e *JBTX*

Transgene	Parentais	Cruzamentos	
hpRNA- <i>rieske</i>	R12/2	R12/2 x J22/4	
		R12/2 x J38/3	
		R12/2 x J39/1	
	R32/2	R32/2 x J22/4	
		R32/2 x J38/3	
		R32/2 x J39/1	
	R2/2	R2/2 x J22/4	
		R2/2 x J38/3	
		R2/2 x J39/1	
	<i>JBTX</i>	J22/4	J22/2 x R12/2
			J22/4 x R32/2
			J22/4 x R2/2
J38/3		J38/3 x R12/2	
		J38/3 x R32/2	
		J38/3 x R2/2	
J39/1		J39/1 x R12/2	
		J39/1 x R32/2	
		J39/1 x R2/2	

Após a polinização controlada, as flores foram cobertas para evitar contaminação com pólen de outras plantas. Algumas flores também foram cobertas no intuito de que ocorresse a autofecundação para obtenção da geração R2.

As sementes R2 resultantes da autofecundação dos eventos e as sementes resultantes dos cruzamentos hpRNA-*rieske* e *JBTX* foram coletadas separadamente e armazenadas a 4 °C até o momento da utilização.

Foram selecionados somente os cruzamentos R12/2xJ22/4 e J22/4xR12/2, juntamente com a geração R2 dos eventos isolados R12/2 e J22/4 para avaliação. Foram semeadas 60 sementes de cada um dos cruzamentos oriundas de três cápsulas diferentes. Para os parentais R12/2 e J22/4 foram semeadas 20 sementes de cada evento.

Foi realizada a coleta de segmentos foliares para a extração de DNA e análise por PCR para verificação da presença dos dois transgenes. Foram coletadas, inicialmente, amostras de 30 plantas de cada cruzamento e 10 plantas de cada um dos parentais. O DNA foi extraído utilizando protocolo CTAB com adição de β -mercaptoetanol. A quantificação e determinação da pureza das amostras foi realizada com nanoespectrofotômetro NanoDropTM2000 (Thermo Scientific, EUA) na absorbância de A_{260} e A_{280} .

O PCR foi realizado utilizando o Kit *Taq DNA polymerase recombinant* (Invitrogen, EUA) seguindo instruções do fabricante. Para a reação de 25 μ l foram adicionados 1,25 μ l de cada um dos *primers*, *forward e reverse* (Tabela 2) na concentração de 10 μ M/ μ l e 5 μ l de DNA na concentração de 50 ng/ μ l. As condições de termociclagem foram: 94 °C por 2 min., 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C e 54 °C por 45 s, para anelamento dos *primers rieske e JBTX*, respectivamente, 72 °C por 1 min. e extensão final a 72 °C por 5 min.

As plantas da geração R2 dos parentais contendo os genes de interesse e as plantas resultantes dos cruzamentos que foram positivas para a presença de ambos os genes foram transferidas para vasos maiores e submetidas ao pré-bioensaio para seleção das melhores plantas de cada evento.

– **Pré-bioensaio das plantas empilhadas com os genes *hpRNA-rieske* e *Jaburetox***

Foram selecionadas dez plantas de cada um dos cruzamentos R12/2xJ22/4 e J22/4xR12/2, quatro plantas pertencente ao evento J22/4 e duas plantas do evento R12/2, além de três plantas não transformadas utilizadas como controle negativo. Para cada tratamento foram montadas duas placas de teste que consistiam de placas de petri onde

foram inoculadas cinco larvas de *H. armigera* de segundo ínstar que foram alimentadas, durante oito dias, com segmentos foliares das plantas geneticamente modificadas. A cada dois dias foi avaliada a mortalidade e, ao final do experimento, foi realizada a pesagem das larvas e a estimativa de consumo total da área foliar pelas larvas e de tamanho das larvas.

Os eventos em que houve maior taxa de mortalidade, somado ao menor peso, consumo de área foliar e tamanho foram selecionados para a realização o bioensaio com maior número de repetições e variáveis analisadas.

– **Bioensaio das plantas transgênicas empilhadas com genes *hpRNA-rieske* e *Jaburetox***

Para a realização do bioensaio foram selecionadas duas plantas do cruzamento R12/2xJ22/4, duas plantas do cruzamento J22/4xR12/2, uma planta de cada um dos parentais J22/4 e R12/2 e três plantas controle negativo.

Cada tratamento foi constituído de cinco repetições com dez larvas em cada repetição, totalizando 50 larvas por tratamento. Foram utilizadas larvas de *H. armigera* em segundo ínstar. As larvas foram mantidas individualizadas em placas de petri de 5 cm de diâmetro contendo discos de papel filtro umedecido. As larvas foram alimentadas com discos foliares de tamanho conhecido das plantas geneticamente transformadas e controle durante dez dias de desenvolvimento larval. Inicialmente foram disponibilizados discos foliares de 1 cm², conforme o crescimento e o aumento da necessidade alimentar das larvas foi aumentado a disponibilização de discos foliares chegando a 4 cm²/dia.

Diariamente foi avaliada a mortalidade e a troca do estágio larval. Nos dias 3, 5, 7, 9 e 10 foi avaliado o consumo e nos dias 4 e 8 e 10 foi realizada a pesagem das larvas. Após o décimo dia de experimento as larvas foram transferidas para dieta artificial (modificada de GREENE et al., 1976) onde foram mantidas por aproximadamente 10 dias. Durante o período em que as larvas permaneceram em dieta foi avaliada a mortalidade das larvas. O delineamento foi completamente casualizado, os dados de

mortalidade foram submetidos à transformação angular enquanto os dados de consumo e peso das larvas foram submetidos a transformação logarítmica. Foi realizada a análise de variância dos dados obtidos e as médias foram comparadas pelo teste Duncan a 5% de significância.

– **Expressão do gene *rieske* em larvas alimentadas com as plantas empilhadas**

Para verificação da eficiência do silenciamento gênico nas larvas alimentadas com as plantas geneticamente modificadas contendo a construção hpRNA-*rieske* (parental R12/2 e plantas oriundas dos cruzamentos R12/2xJ22/4 e J22/4xR12/2) foi realizada a coleta do sistema digestório e dos tecidos do restante do corpo das larvas em terceiro estágio de desenvolvimento para análise da expressão do gene *rieske*. No bioensaio utilizando as plantas que continham a construção para expressão do hpRNA-*rieske* foram adicionadas 15 larvas por tratamento visando a coleta dos insetos para realização do RT-qPCR. Foram coletadas três replicatas biológicas para cada tratamento, cada uma contendo três larvas em terceiro ínstar.

O RNA foi extraído utilizando Trizol (Sigma-Aldrich, EUA), seguindo protocolo de Chomczynski & Mackey (1995). A quantificação e determinação da pureza das amostras foi realizada com nanoespectrofotômetro NanoDropTM2000 (Thermo Scientific, EUA) na absorvância de A₂₆₀ e A₂₈₀. 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), seguindo as instruções do fabricante.

O RT-qPCR foi realizado utilizando o *Kit* Fast SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação de 20 µl, foi utilizado 0,5 µl de cada um dos *primers*, *foward e reverse* (Tabela 2) na concentração de 10 µM/µl e 2 µl de cDNA diluído a 5 ng/ µl. 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

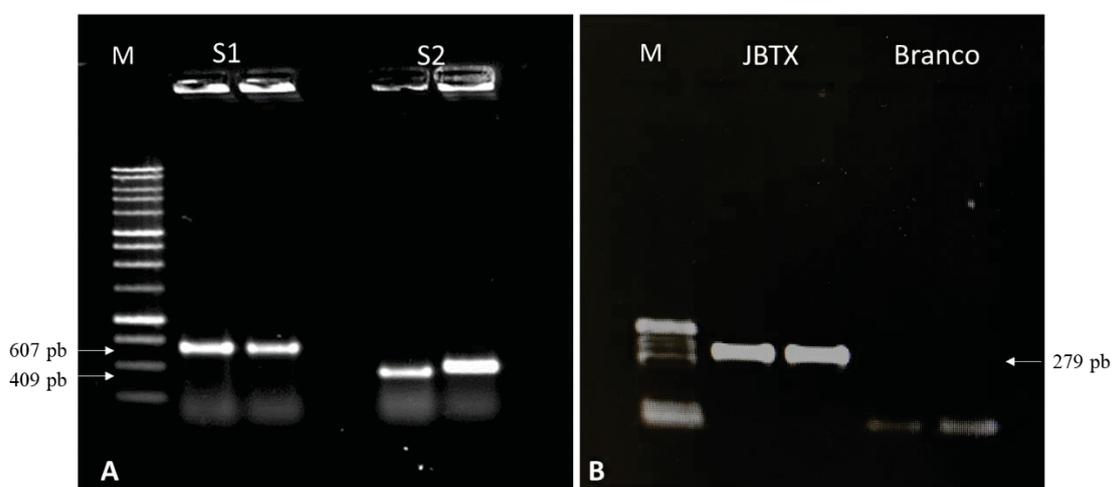
equipamento Step One Plus (Thermo Scientific, EUA). Para análise da pureza dos produtos do RT-qPCR foi realizada a análise da curva de dissociação (curva de *Melting*) de 65 °C à 95 °C. Todas as amostras foram amplificadas em duplicatas técnicas e o gene *efl-α* foi utilizado como gene de referência. A expressão relativa do gene *rieske* foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e as médias comparadas pelo teste T.

4 RESULTADOS

4.1 Construções gênicas

A presença das sequências senso (S1) e antissenso (S2) do gene *rieske*, bem como o gene *Jaburetox* em *E. coli* transformadas com os plasmídeos pMCG1005/S1/S2 e pMCG1005/JBTX foi confirmada por PCR. As colônias positivas foram crescidas em meio LB líquido com os antibióticos adequados e os plasmídeos foram purificados. A eletroporação dos plasmídeos purificados em *A. tumefaciens* eletrocompetentes foi eficiente, sendo que a presença dos genes de interesse foi confirmada via PCR (Figura 4).

Figura 4 - PCR de *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 geneticamente transformadas contendo os plasmídeos binários PMCG1005/S1/S2 (A) e pMCG1005/JBTX (B). Passo Fundo, 2017



4.2 Transformação genética de tabaco (*Nicotiana tabacum*)

O processo de transformação utilizando *A. tumefaciens* (Figura 5) foi eficiente para a obtenção de plantas geneticamente modificadas de tabaco contendo as construções hpRNA-*rieske* e *JBTX*. Foi possível, durante o processo de seleção, a obtenção e

isolamento dos propágulos desenvolvidos sobre os explantes submetidos a transformação genética. O método de seleção empregado, utilizando o herbicida Bialaphos[®], se mostrou eficiente na seleção dos tecidos geneticamente modificados (Figura 6). Os propágulos desenvolvidos sobre os explantes durante o processo de seleção foram isolados e regeneraram plantas completas.

Figura 5 - Principais etapas do processo de transformação genética, cultivo *in vitro* e aclimatização das plantas de tabaco. Precipitação de *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 via centrifugação (A). Contato dos explantes com as bactérias ressuspendidas em meio de infecção (B), seguido da secagem dos explantes para evitar excesso de bactéria (C). Detalhe dos meristemóides desenvolvidos via organogênese direta em segmentos foliares (D), aspecto das brotações formadas (E e F). Isolamento dos propágulos (G), propágulos em meio de enraizamento (H). Plantas em processo de aclimatização mantidas cobertas com sacos plásticos para manutenção da umidade (I). Plantas aclimatadas em câmara de cultura (J) e plantas transferidas para casa de vegetação (L). Passo Fundo, 2017

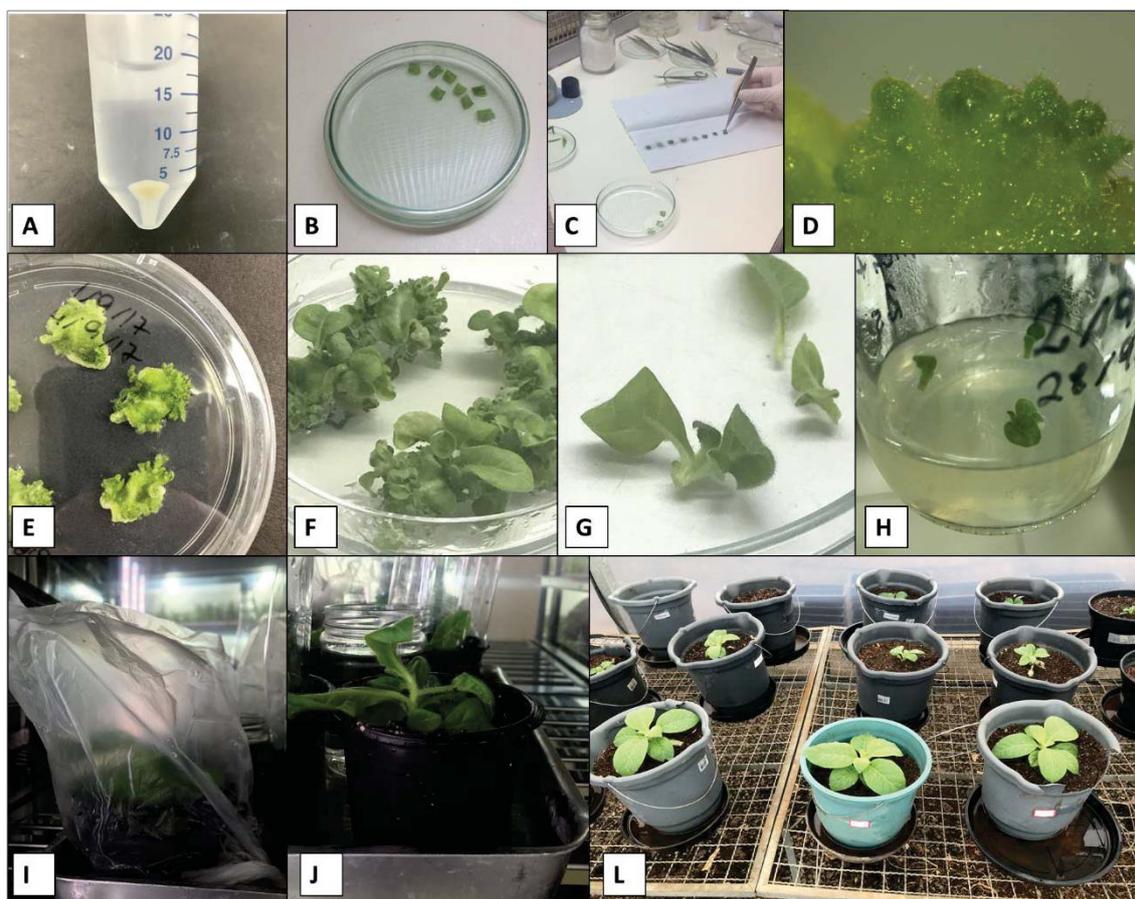
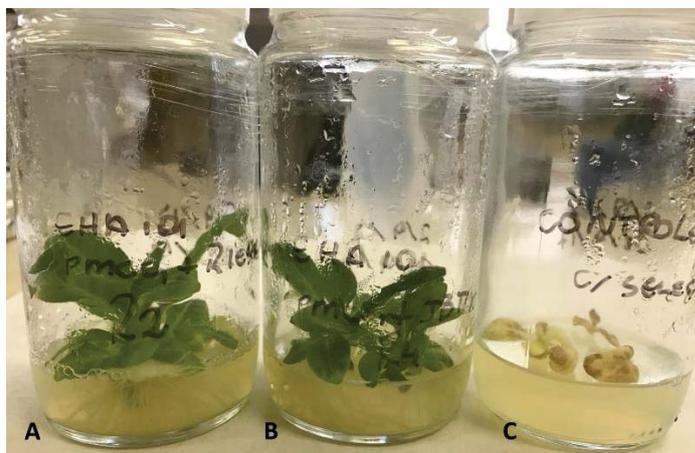


Figura 6 - Plantas de tabaco geneticamente modificadas contendo as construções hpRNA-*rieske* (A), *JBTX* (B) e plantas não transformadas (C) em meio de enraizamento contendo 3 mg/L do herbicida Bialaphos® como agente seletivo. Passo Fundo 2017.



As plantas transgênicas obtidas apresentavam morfologia normal, crescimento e desenvolvimento similar as plantas não transformadas, indicando que não houve efeitos deletérios da presença dos transgenes na planta. A tabela 4 apresenta a relação de plantas transgênicas R0 aclimatizadas e positivas para a expressão do gene *bar* pelo *leaf painting assay*.

Tabela 4 - Relação do número de plantas R0 de tabaco enraizadas, aclimatizadas e expressando o gene *bar* pelo *leaf painting assay* obtidas em cada um dos experimentos realizados. Passo Fundo, 2017

Data do experimento	Plasmídeo pMCG1005	Plantas enraizadas (n)	Plantas aclimatizadas (n)	Plantas positivas <i>leaf painting assay</i> (n)
02/09/2017	S1/S2	50	14	12
	JBTX	25	6	4
13/09/2017	S1/S2	30	21	15
	JBTX	36	24	23
15/09/2017	S1/S2	37	14	7
	JBTX	54	27	20
19/09/2017	S1/S2	-	-	-
	JBTX	11	4	4
Total		243	110	85

Fonte: Dados do autor.

No caso do tabaco cada planta regenerada é considerada um evento, pois se desenvolveu por organogênese direta. No total foram aclimatizados 49 eventos transformados com o gene para expressão do hpRNA-*rieske* e 61 eventos transformados

com o gene para expressão da proteína entomotóxica JBTX. Destes, foram positivos, pela expressão do gene marcador *bar*, 34 e 51 eventos hpRNA-*rieske* e JBTX, respectivamente. Todos os 34 eventos hpRNA-*rieske* produziram sementes, porém, dos 51 eventos JBTX, dois não produziram sementes. As sementes R1 resultantes da autofecundação dos eventos R0 foram coletadas e posteriormente semeadas em casa de vegetação.

4.3 Análises moleculares e bioensaios

4.3.1 Geração R1 das plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*)

As sementes R1, originadas da autofecundação das plantas R0, foram semeadas em floreiras na casa de vegetação e quando atingiram 10-12 cm de altura foram submetidas à pulverização com o herbicida glufosinato de amônio (1%). Após sete dias foi verificado o efeito do herbicida nas plantas relacionado com a expressão do gene marcador *bar* (Figura 7).

Figura 7 - Avaliação da expressão do gene marcador *bar* em plantas R1 de tabaco tratadas com o herbicida glufosinato de amônio 1%. Plantas sobreviventes e saudáveis são positivas para a expressão do gene marcador e plantas mortas (seta) são negativas para a expressão do gene marcador. Passo Fundo, 2018

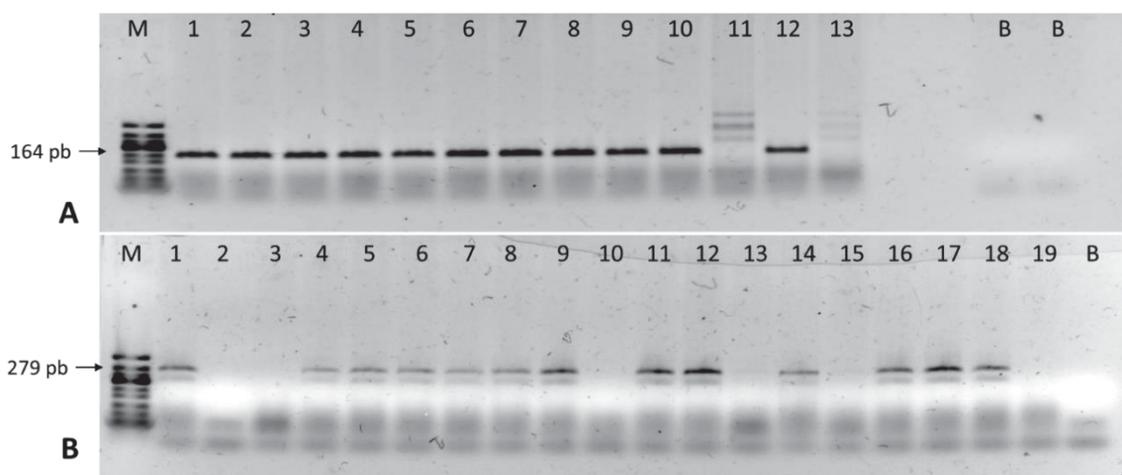


Dos eventos hpRNA-*rieske* foram obtidas 192 plantas R1 pertencentes a 34 eventos, destas, 132 foram positivas para a expressão do gene marcador *bar*, pertencentes a 32 eventos diferentes. Das plantas *bar* positivas foi realizado a coleta de amostras de

125 plantas para a análise da presença do gene de interesse *hpRNA-rieske*. Destas, 123 foram PCR positivas, pertencentes a 32 eventos (Figura 8 A).

Dos eventos JBTX foram obtidas 330 plantas R1 pertencentes a 49 eventos, destas, 231 foram positivas para a expressão do gene marcador *bar*, pertencentes a 46 eventos. Foi realizada a coleta de amostra de 209 plantas para a realização da extração de DNA e PCR para análise da presença do gene *JBTX*. Das 209 plantas avaliadas por PCR, 172 foram positivas para a presença do gene de interesse *JBTX*, sendo estas pertencentes a 38 eventos diferentes (Figura 8 B).

Figura 8 - PCR das plantas R1 de tabaco positivas para a expressão do gene *bar* via *leaf painting assay* para confirmação da presença dos genes de interesse A) *hpRNA-rieske* e, B) *JBTX*. Passo Fundo, 2018



Foi possível observar que algumas plantas positivas para a expressão do gene marcador *bar* via *leaf painting assay* não continham o gene de interesse pela análise de PCR, demonstrando a possibilidade de inserção somente do gene marcador ou perda do gene de interesse entre uma geração e outra.

– **Pré-bioensaio da geração R1 de tabaco transgênico com *Helicoverpa armigera***

Foi obtido um elevado número de plantas positivas para a presença dos genes de interesse hpRNA-*rieske* e *JBTX*, fator que inviabilizou a realização de bioensaio com todas as plantas para verificação do efeito entomotóxico do hpRNA-*rieske* e *JBTX* e potencial de controle destas substâncias inseticidas para o controle do inseto-praga *H. armigera*. Desta forma, inicialmente, foi realizado um pré-bioensaio, com o objetivo de selecionar as melhores plantas baseado na mortalidade, peso, consumo e tamanho das larvas alimentadas com as plantas transgênicas. As melhores plantas foram utilizadas para a realização do bioensaio com maior número de repetições e variáveis analisadas. A realização de avaliações prévias para verificação dos efeitos causados pela alimentação com plantas transgênicas expressando as substâncias inseticidas e seleção dos melhores eventos para uma avaliação mais robusta e detalhada tem sido utilizada por outros grupos de pesquisa (MAMTA et al., 2016; SAINI et al., 2018).

Para o pré-bioensaio foram selecionadas 61 plantas de 32 eventos hpRNA-*rieske*, 64 plantas de 36 eventos *JBTX* e três plantas não submetidas a transformação como controle negativo para a realização do pré-bioensaio com o inseto-praga *H. armigera*. As plantas selecionadas estavam em estágio de desenvolvimento semelhantes.

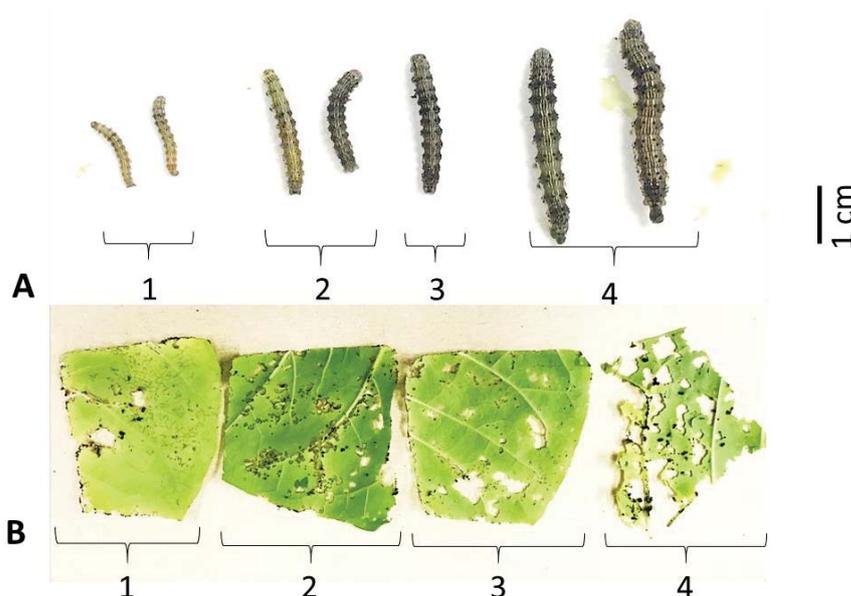
Plantas hpRNA-*rieske*

A mortalidade entre os 61 eventos transgênicos hpRNA-*rieske* variou entre 0 e 80%, sendo que as maiores taxas de mortalidade foram observadas nos eventos R12/2, R26/5 e R32/2. A mortalidade média do controle foi de 30% (Figura 9). O peso médio das larvas alimentadas com as plantas transgênicas variou entre 5 mg e 120 mg, sendo que o peso médio do controle foi de 56 mg (Figura 10).

Foi possível observar uma grande variação no perfil de resposta entre as plantas contendo o gene hpRNA-*rieske*, inclusive plantas irmãs, pertencentes ao mesmo evento, apresentaram um padrão de resposta das larvas completamente diferente.

Para avaliação da estimativa de consumo e tamanho das larvas alimentadas por oito dias com plantas contendo o hpRNA-*rieske*, foi empregado uma escala de notas variando de 1 a 4, conforme Figura 11.

Figura 11 - Escala de notas utilizada para avaliação do tamanho (A) e consumo de área foliar (B) das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas por oito dias com plantas de tabaco geneticamente modificadas contendo o gene hpRNA-*rieske*. Passo Fundo, 2018

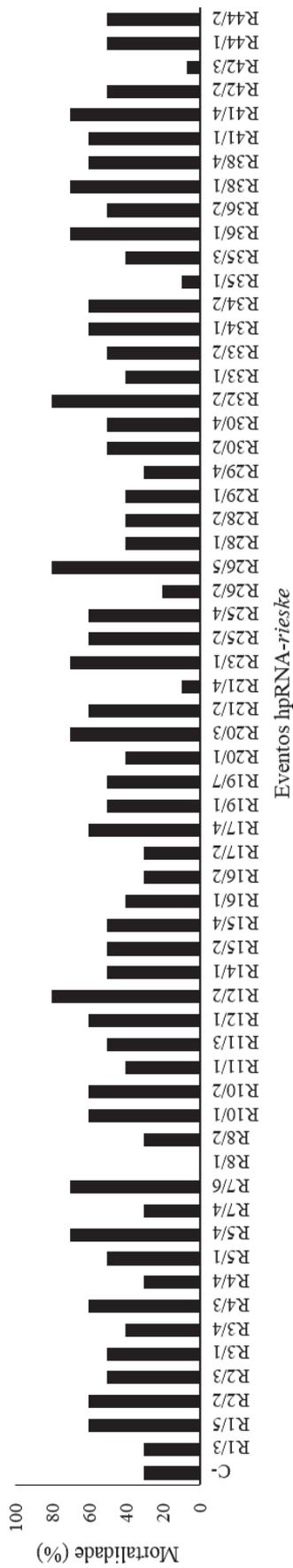


Os dados de consumo (Figura 12) em geral, estão associados a mortalidade, de forma que, quanto maior a mortalidade das larvas menor foi o consumo de área foliar. Por exemplo, as lagartas alimentadas com as plantas R26/5 e R32/2, apresentaram as maiores taxas de mortalidade (80%) e conseqüentemente menor consumo da área foliar.

Quanto ao tamanho, destaca-se as plantas do evento R10 (R10/1 e R10/2) e as plantas R26/5 e R32/2 com o menor tamanho (Figura 13). Estas plantas também apresentaram resultados de peso e consumo reduzido em relação ao controle e demais tratamentos.

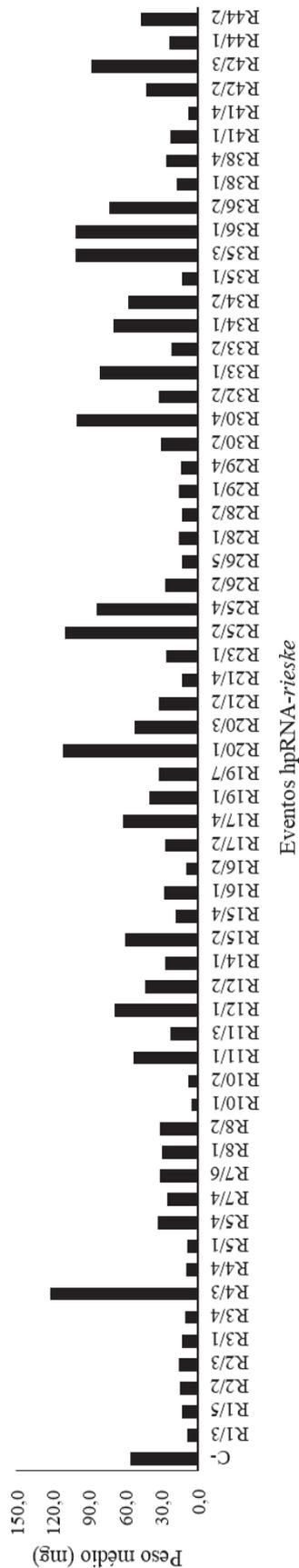
Considerando os dados obtidos no pré-bioensaio, foram selecionados os seguintes eventos hpRNA-*rieske*: R2/2, R10/1, R10/2, R12/2, R26/5, R32/2, R38/1 e R41/4 que se destacaram por apresentar mortalidade elevada e redução no peso, consumo e tamanho.

Figura 9 - Mortalidade das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas, durante oito dias, com segmentos foliares de 61 plantas de tabaco geneticamente modificadas de tabaco (geração R1) contendo o gene para expressão do hpRNA-*rieske*. Passo Fundo, 2018



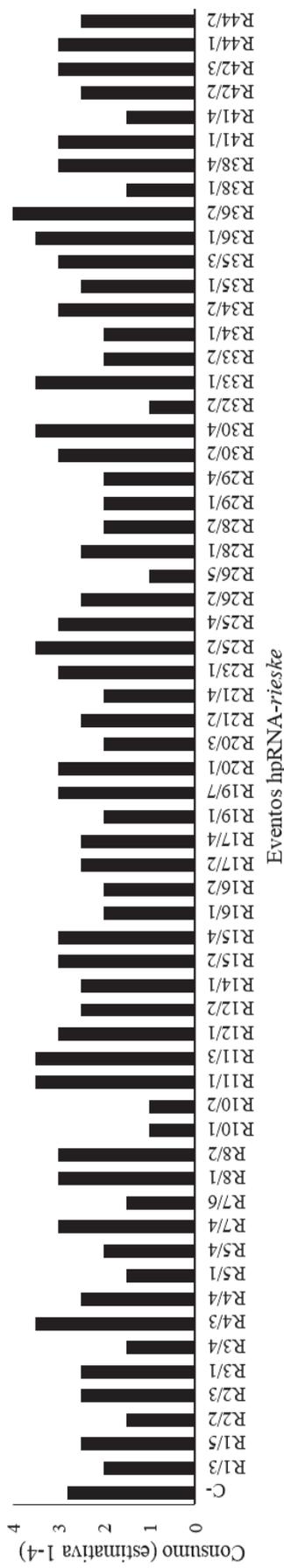
Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=10). C- = Controle negativo.

Figura 10 - Peso médio das larvas de *Helicoverpa armigera* após oito dias de alimentação com segmentos foliares de 61 plantas geneticamente modificadas de tabaco (geração R1) contendo o gene para expressão do hpRNA-*rieske*. Passo Fundo, 2018



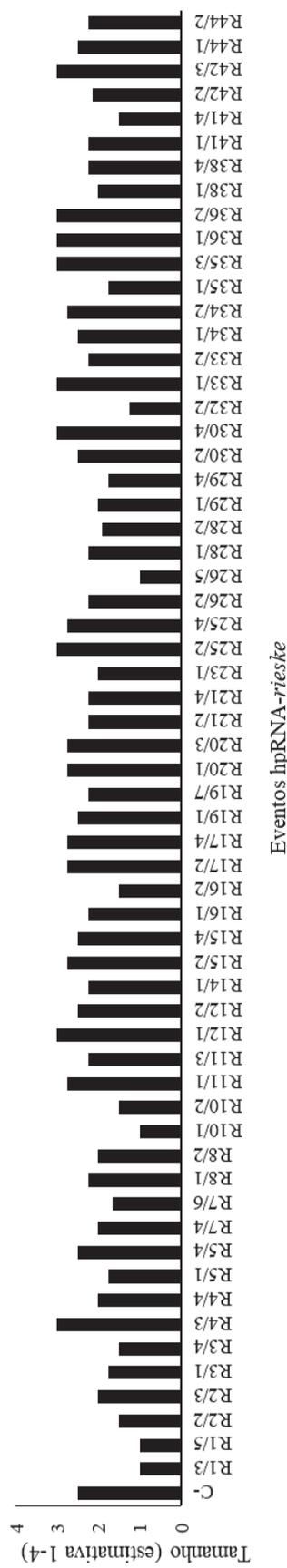
Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=10). C- = Controle negativo.

Figura 12 - Estimativa de consumo de área foliar das larvas de *Helicoverpa armigera* após oito dias de alimentação com segmentos foliares de 61 plantas geneticamente modificadas de tabaco (geração R1) contendo o gene para expressão do hpRNA-*rieske*. Passo Fundo, 2018



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=10). C- = Controle negativo.

Figura 13 - Estimativa de tamanho das larvas de *Helicoverpa armigera* após oito dias de alimentação com segmentos foliares de 61 plantas geneticamente modificadas de tabaco (geração R1) contendo o gene para expressão do hpRNA-*rieske*. Passo Fundo, 2018



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=10). C- = Controle negativo

Plantas JBTX

A mortalidade dos eventos *JBTX* variou de 20 a 90%, sendo a maior mortalidade observada nos eventos J22/4 e J39/1. A mortalidade do controle foi de 30% (Figura 14) e o peso médio variou entre 5 e 250 mg, com o controle apresentando peso médio de 56 mg (Figura 15).

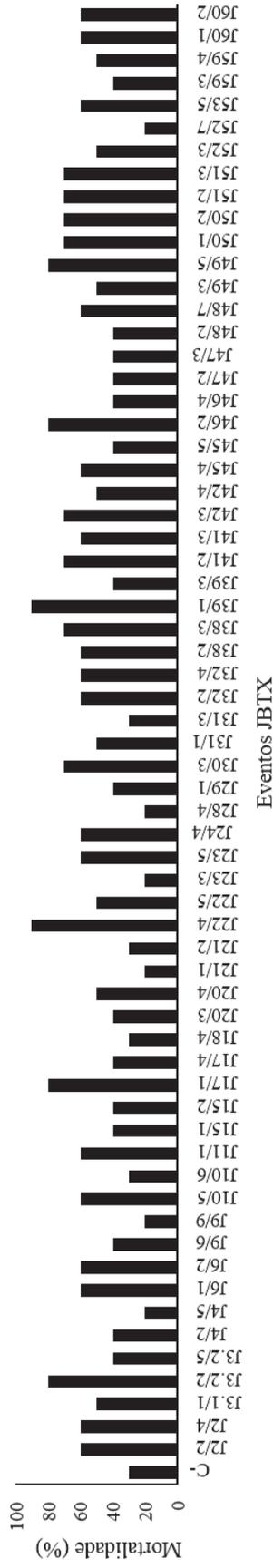
O maior peso das larvas alimentadas com as plantas contendo o gene para expressão do *JBTX* em relação as plantas contendo o gene *hpRNA-rieske* pode ser devido a um dos mecanismos de ação do *JBTX* que interfere na excreção por afetar os túbulos de Malpighi (CARLINI et al., 1997).

Da mesma forma citada anteriormente para as plantas *hpRNA-rieske*, foi avaliada a estimativa de consumo e tamanho pela utilização da escala de notas de 1 a 4. Quanto ao consumo (Figura 16) destaca-se a planta J3.2/2 com o menor consumo de área foliar pelas larvas aliado a alta mortalidade. As larvas alimentadas com esta planta também apresentaram menor tamanho (Figura 17) e peso, desta forma, podemos inferir que além de causar mortalidade, as larvas sobreviventes alimentadas com a planta J3.2/2 apresentaram menor consumo resultando em menor tamanho e peso.

Os resultados com as plantas *JBTX*, da mesma forma que o observado com as plantas *hpRNA-rieske*, apresentaram grande variação na resposta das larvas à alimentação com as plantas transgênicas. Isto demonstra que diversos fatores podem interferir na eficiência das substâncias inseticidas, incluindo os diferentes locais de inserção dos transgenes, diferenças na expressão dos transgenes e homozigose.

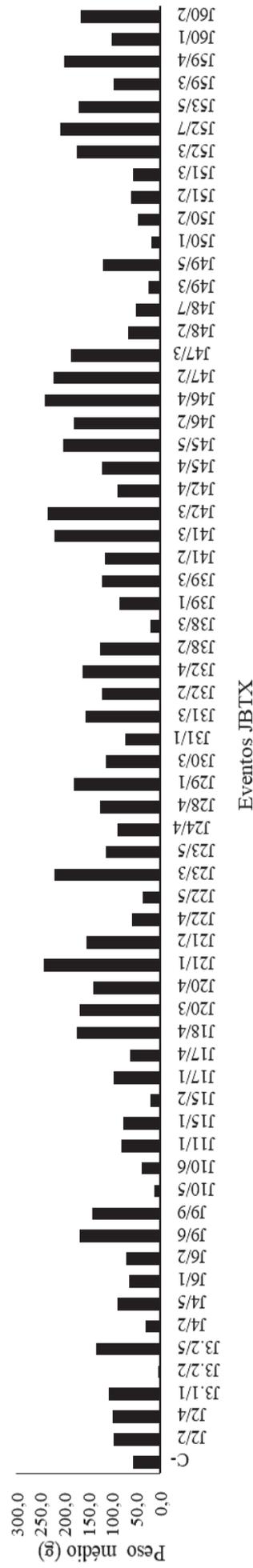
De acordo com os resultados obtidos com os eventos *JBTX* foram selecionadas as seguintes plantas: J3.2/2, J10/5, J17/1, J22/4, J38/3, J39/1, J50/1 e J51/2 para a realização do bioensaio.

Figura 14 - Mortalidade das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas, durante oito dias, com segmentos foliares de 64 plantas geneticamente modificadas de tabaco (geração R1) portadoras do gene da proteína entomotóxica Jaburetox. Passo Fundo, 2018



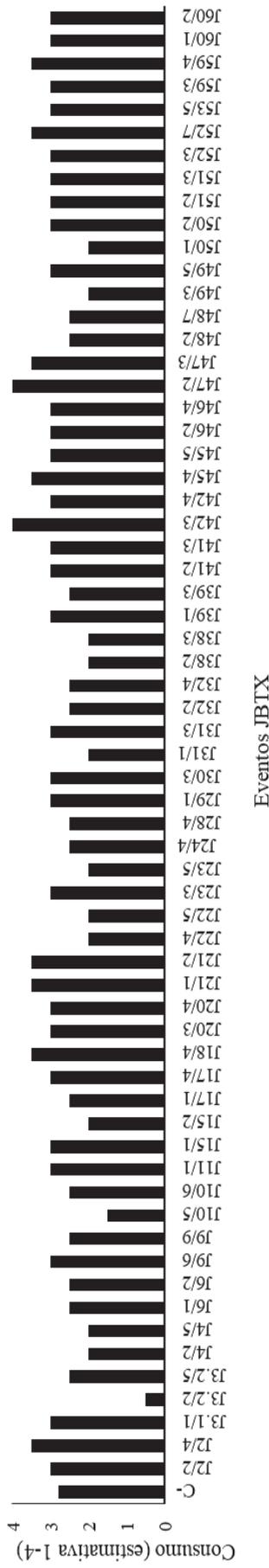
Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=10). C- = Controle negativo

Figura 15 - Peso médio das larvas de *Helicoverpa armigera* após oito dias de experimento em que foram alimentadas com segmentos foliares de 64 plantas geneticamente modificadas de tabaco (geração R1) portadoras do gene *JBTX*. Passo Fundo, 2018



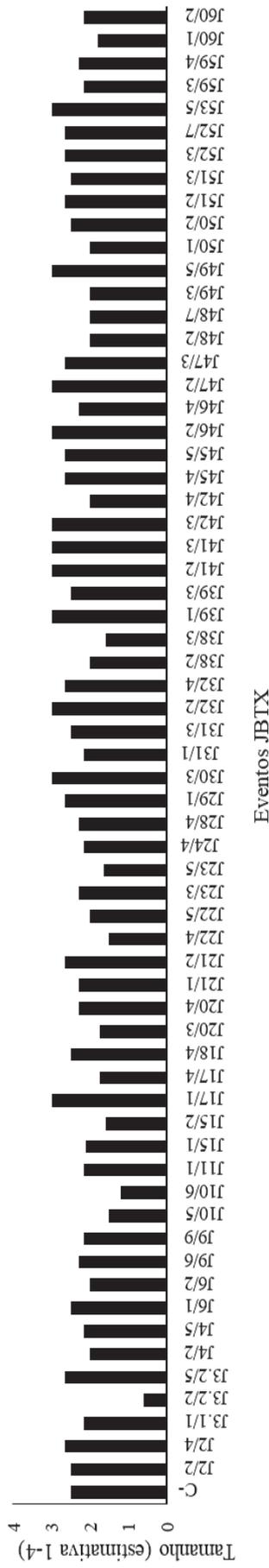
Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=10). C- = Controle negativo

Figura 16 - Estimativa de consumo das larvas de *Helicoverpa armigera* após oito dias de experimento em que foram alimentadas com segmentos foliares de 64 plantas geneticamente modificadas de tabaco (geração R1) portadoras do gene *JBTX*. Passo Fundo, 2018



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=10). C- = Controle negativo

Figura 17 - Estimativa de tamanho das larvas de *Helicoverpa armigera* após oito dias de experimento em que foram alimentadas com segmentos foliares de 64 plantas geneticamente modificadas de tabaco (geração R1) portadoras do gene *JBTX*. Passo Fundo, 2018



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=10). C- = Controle negativo

– **Bioensaio da geração R1 de tabaco transgênico com *Helicoverpa armigera***

Devido a amplitude do experimento, inicialmente foram testadas as plantas geneticamente transformadas contendo a construção do hpRNA-*rieske* e, posteriormente, as plantas geneticamente modificadas com o gene *JBTX*.

Plantas hpRNA-*rieske*

As larvas de segundo instar de *H. armigera* foram alimentadas com discos foliares das plantas R2/2, R10/1, R10/2, R12/2, R26/5, R32/2, R38/1 e R41/4 por dez dias. Após este período foram transferidas para dieta artificial (modificado de Greene et al., 1976), sem a adição de nenhuma substância entomotóxica.

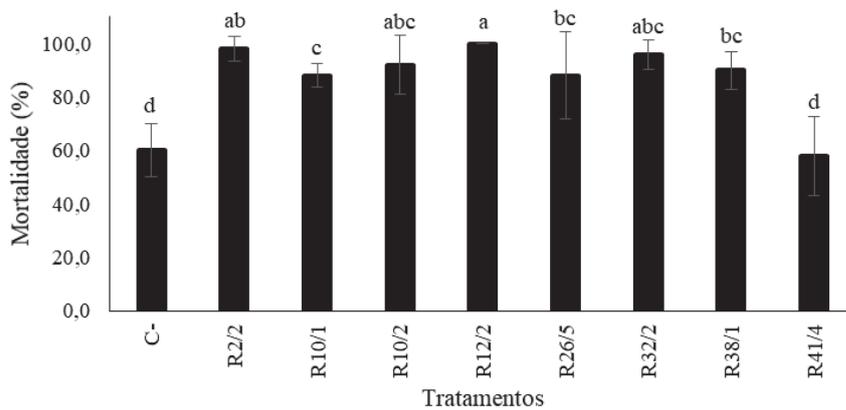
Ao final dos dez dias do experimento, larvas alimentadas com sete dos oito eventos transgênicos hpRNA-*rieske* apresentaram maior mortalidade (88 a 100%) comparada ao controle (60%). Somente o evento R41/4 não apresentou diferença do controle quanto a mortalidade das larvas (Figura 18).

Após a transferência para dieta, onde as larvas foram mantidas por, aproximadamente, 10 dias, foi avaliado a mortalidade das larvas, da mesma forma, as sete plantas R2/2, R10/1, R10/2, R12/2, R26/5, R32/2 e R38/1 se mostraram superiores ao controle, com exceção a planta R41/4 (Figura 19). Considerando a mortalidade acumulada (mortalidade na planta + mortalidade na dieta) foi obtido 100% de mortalidade nas larvas alimentadas com os eventos R12/2 e R32/2 (Figura 19). No entanto, não houve aumento expressivo da mortalidade quando as larvas foram colocadas em dieta. Este fato pode ser decorrente da ausência de efeito entomotóxico residual pelo mecanismo de RNAi em lepidópteros, demandando alimentação contínua com moléculas desencadeadoras do processo de silenciamento.

O RNAi apresenta melhores resultados de controle de lepidópteros quando disponibilizado via oral utilizando plantas transgênicas (TERENIUS et al., 2011). A possibilidade de produção e disponibilização contínua de altas doses de hpRNA, além da

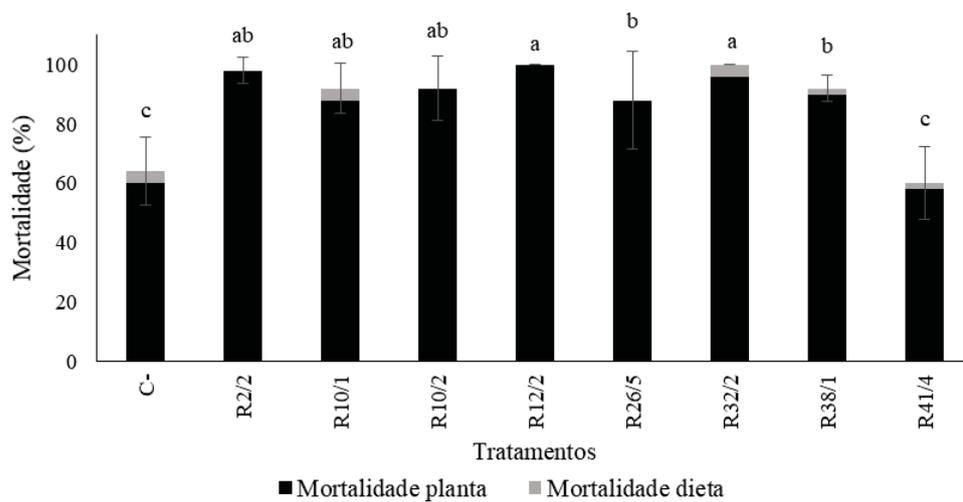
proteção ao hpRNA que a célula vegetal oferece são os fatores que determinam o sucesso da utilização de plantas transgênicas expressando o hpRNA no controle de insetos praga, especialmente lepidópteros (TERENIUS et al., 2011; GARBUTT et al., 2013; MAMTA et al., 2016).

Figura 18 - Mortalidade das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com discos foliares de plantas geneticamente modificadas de tabaco com a construção gênica para a expressão do hpRNA-*rieske* por dez dias. Passo Fundo, 2018



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=50) ± desvio padrão. As mesmas letras sobre as colunas não diferem estatisticamente pelo teste Duncan (p<0,05). C- = Controle negativo.

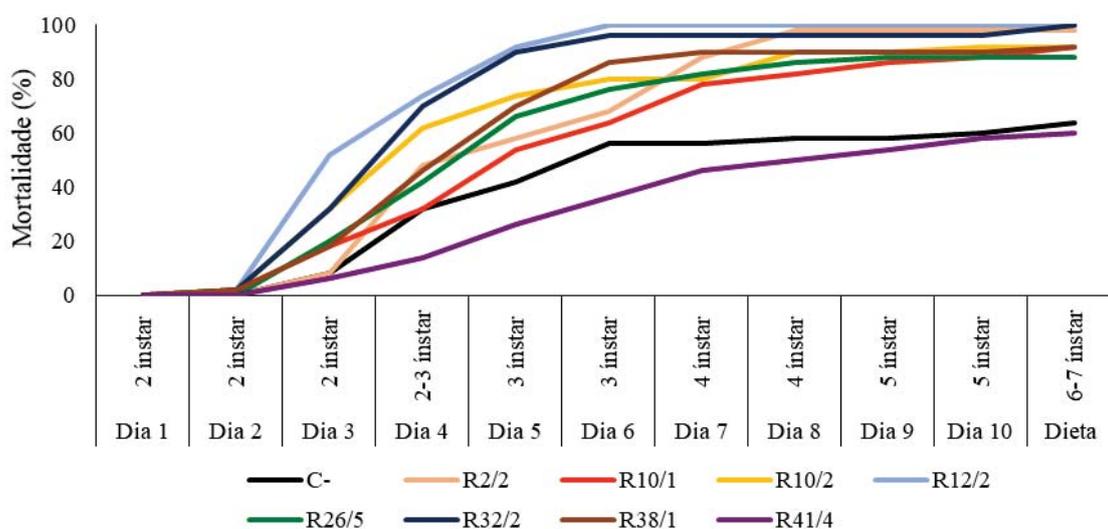
Figura 19 - Mortalidade acumulada das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas por dez dias com plantas transgênicas de tabaco contendo a construção para expressão do hpRNA-*rieske* e após transferência para dieta artificial. Passo Fundo, 2018.



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=50) ± desvio padrão. As mesmas letras sobre as colunas não diferem estatisticamente pelo teste Duncan (p<0,05). C- = Controle negativo.

Considerando a mortalidade acumulada ao longo do experimento é possível verificar que a maior de mortalidade ocorreu entre os dias 3 e 5, período que compreende, especialmente, a troca de estágio de desenvolvimento larval, do segundo para o terceiro ínstar, sendo este um dos períodos mais críticos para a sobrevivência das larvas (Figura 20).

Figura 20 - Mortalidade acumulada ao longo do experimento com larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas por dez dias com plantas transgênicas de tabaco portando o gene para expressão do hpRNA-*rieske* e mais dez dias com dieta artificial. Passo Fundo, 2018



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=50). C- = Controle negativo.

O controle negativo, que consistiu de plantas de tabaco não submetidas ao processo de transformação, apresentou elevada mortalidade. Danos resultantes da manipulação das larvas podem resultar na mortalidade das mesmas. Além disso, o aumento no número de instares no desenvolvimento larval, mesmo após a transferência para dieta artificial pode ser um indicativo da presença de aleloquímicos e/ou ausência de nutrientes primários para o desenvolvimento das larvas (SLANSKY Jr; RODRIGUEZ, 1987). Para melhor visualização da mortalidade ocorrida nos tratamentos foi realizado o cálculo de mortalidade efetiva, ou seja, da mortalidade acumulada dos tratamentos foi subtraído a mortalidade do controle (Tabela 5).

Tabela 5 - Mortalidade acumulada e mortalidade efetiva das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com plantas transgênicas de tabaco contendo o gene para expressão do hpRNA-*rieske* por dez dias seguidos por dez dias em dieta, Passo Fundo, 2018

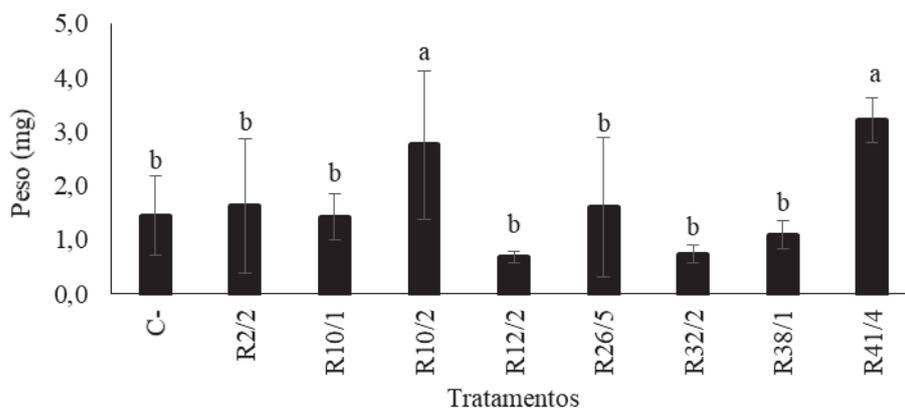
Tratamentos	Mortalidade acumulada (%)	Mortalidade efetiva (%) ¹
C-	64	
R2/2	98	34
R10/1	92	28
R10/2	92	28
R12/2	100	36
R26/5	88	24
R32/2	100	36
R38/1	92	28
R41/4	60	-4

(1) Mortalidade tratamento – Mortalidade controle

Nota: C- = Controle negativo.

O peso das larvas foi mensurado após quatro dias do experimento. A maioria dos tratamentos hpRNA-*rieske* não diferiram do controle quanto ao peso das lagartas. No entanto as larvas alimentadas com as plantas R41/4 e R10/2 apresentaram o maior peso que o controle (Figura 21).

Figura 21 - Peso médio das larvas de *Helicoverpa armigera* aos 4 dias de experimento, alimentadas com plantas transgênicas de tabaco portadoras do gene hpRNA-*rieske*. Passo Fundo, 2018



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=50) ± desvio padrão. As mesmas letras sobre as colunas não diferem estatisticamente pelo teste Duncan (p<0,05). C- = Controle negativo.

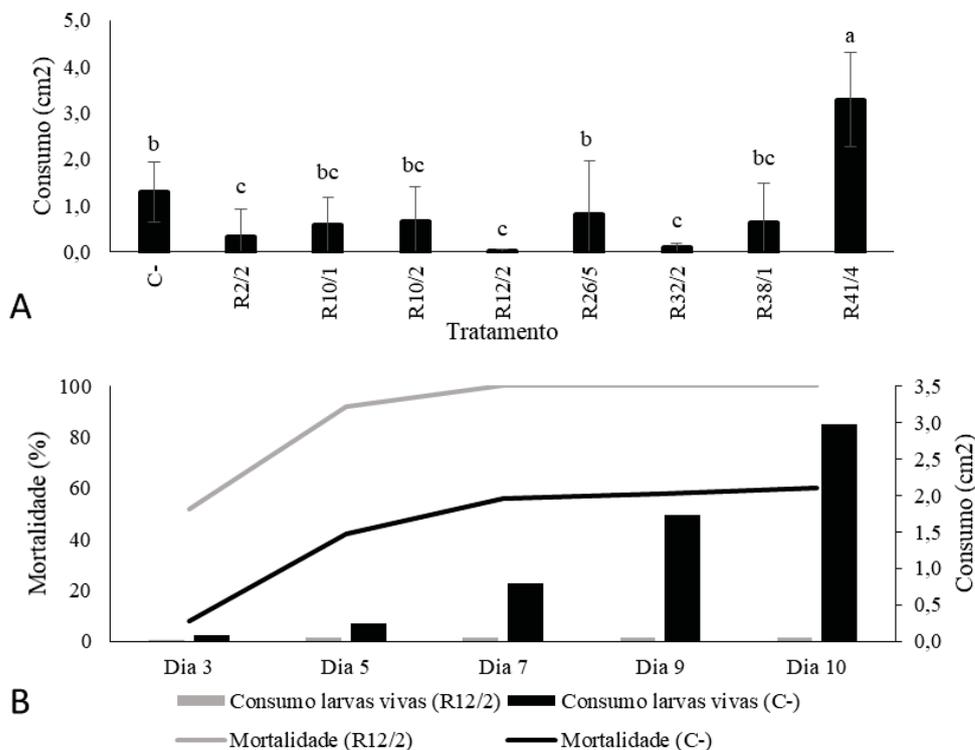
Não foram considerados os dados de pesagem realizados aos oito e dez dias de experimento em virtude do baixo número de larvas sobreviventes que foram utilizadas para as coletas dos dados.

O consumo médio total do tecido foliar por larva ao final dos dez dias do experimento foi avaliado para todos os tratamentos. Os menores consumos foram observados nas larvas alimentadas com os eventos R2/2, R12/2 e R32/2 (Figura 22 A). Esta variável está intimamente relacionada com a mortalidade das larvas, visto que estes eventos causaram alta mortalidade (Figura 18). Já as larvas alimentadas com a planta R41/4 apresentaram consumo maior que as larvas alimentadas com a planta controle (Figura 22 A), este evento também apresentou a menor mortalidade em relação aos demais eventos transgênicos.

As larvas alimentadas com a planta R12/2 consumiram $0,04 \text{ cm}^2$, da área foliar, isso representa aproximadamente 32 vezes menos área foliar comparada com a área consumida pelo controle ($1,3 \text{ cm}^2$) (Figura 22A). Traduzindo esses dados para uma situação de campo, o emprego destas plantas resultaria numa drástica redução de consumo das plantas pelas lagartas, o que poderia reduzir grandemente a perda da produtividade pelo ataque de insetos. Essa drástica redução do consumo observada no presente experimento ocorreu devido à alta mortalidade das larvas alimentadas com a planta R12/2, chegando a 100% no sexto dia de experimento.

A figura 22 B mostra o consumo médio acumulado por larva viva alimentadas com a planta R12-2 e controle e a mortalidade avaliados ao longo dos dez dias de experimento. Essa figura retrata o comportamento alimentar das lagartas vivas ao longo do experimento, informando a taxa de mortalidade ao longo do mesmo. É possível verificar o baixo consumo de área foliar mesmo pelas lagartas sobreviventes, fator de grande importância agrônômica pois representa menor dano causado pelas larvas somado a alta mortalidade.

Figura 22 - Consumo médio total por larva de *Helicoverpa armigera* alimentadas com discos foliares das de tabaco com a construção gênica para a expressão do hpRNA-*rieske* (A); consumo médio das larvas sobreviventes e comparação com a mortalidade das lagartas alimentadas com o evento R12/2 contendo o gene para expressão do hpRNA-*rieske* em relação ao controle negativo (B). Passo Fundo, 2018



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=50) ± desvio padrão. As mesmas letras sobre as colunas não diferem estatisticamente pelo teste Duncan (p<0,05). C-= controle negativo.

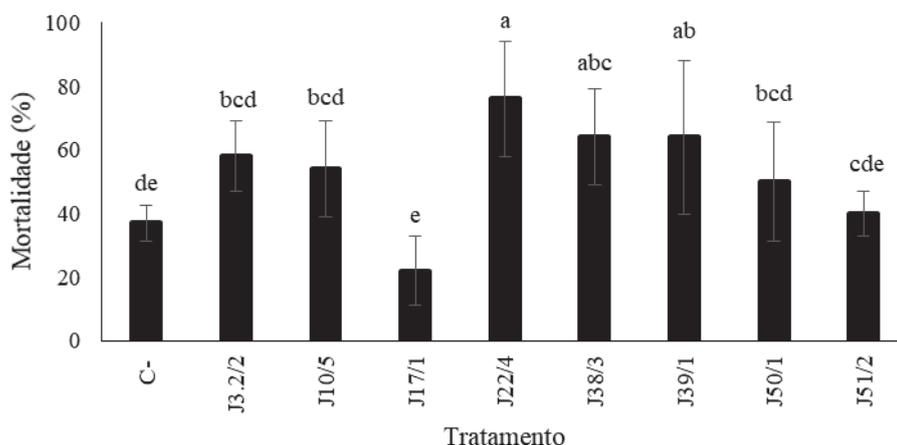
Plantas Jaburetox

Da mesma forma que no bioensaio com as plantas hpRNA-*rieske*, as larvas foram alimentadas durante dez dias com os discos foliares das plantas contendo o gene para expressão do JBTX e posteriormente foram transferidos para dieta sem a adição de nenhuma molécula entomotóxica.

Durante o período em que as larvas estiveram sendo alimentadas com discos foliares das plantas transgênicas, a maior mortalidade foi observada nas plantas J22/4, J38/3 e J39/1 com 76% de mortalidade no evento J22/4 e 64% de mortalidade para os eventos J38/3 e J39/1. Os demais tratamentos não diferiram do controle (35%) (Figura 23).

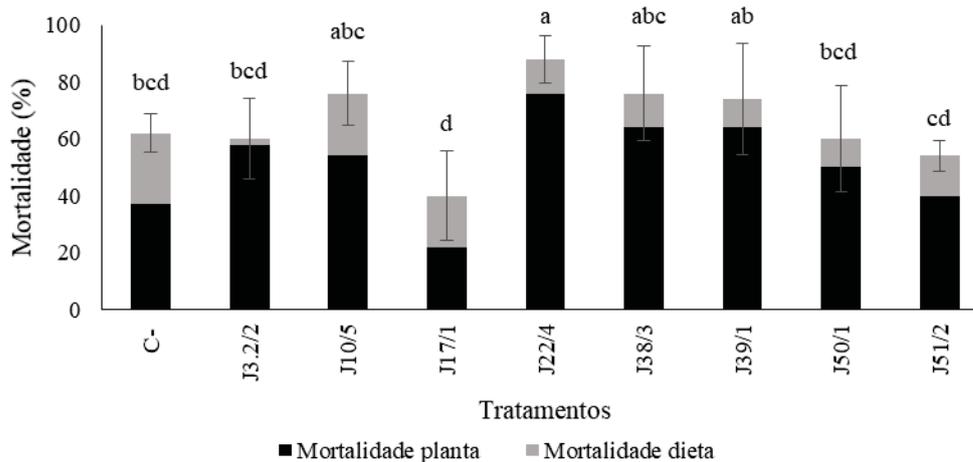
Considerando a mortalidade acumulada, que ocorreu enquanto as larvas estavam sendo alimentadas com discos foliares e, posteriormente com dieta artificial por, aproximadamente, dez dias, a maior mortalidade ocorreu nas larvas alimentadas com o evento J22/4 (88%). Os demais tratamentos não diferiram do controle (62%) (Figura 24).

Figura 23 - Mortalidade das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com discos foliares de plantas geneticamente modificadas de tabaco para expressão da proteína entomotóxica Jaburetox ao final dos dez dias de experimento. Passo Fundo, 2018



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=50) ± desvio padrão. As mesmas letras sobre as colunas não diferem estatisticamente pelo teste Duncan (p<0,05). C- = Controle negativo.

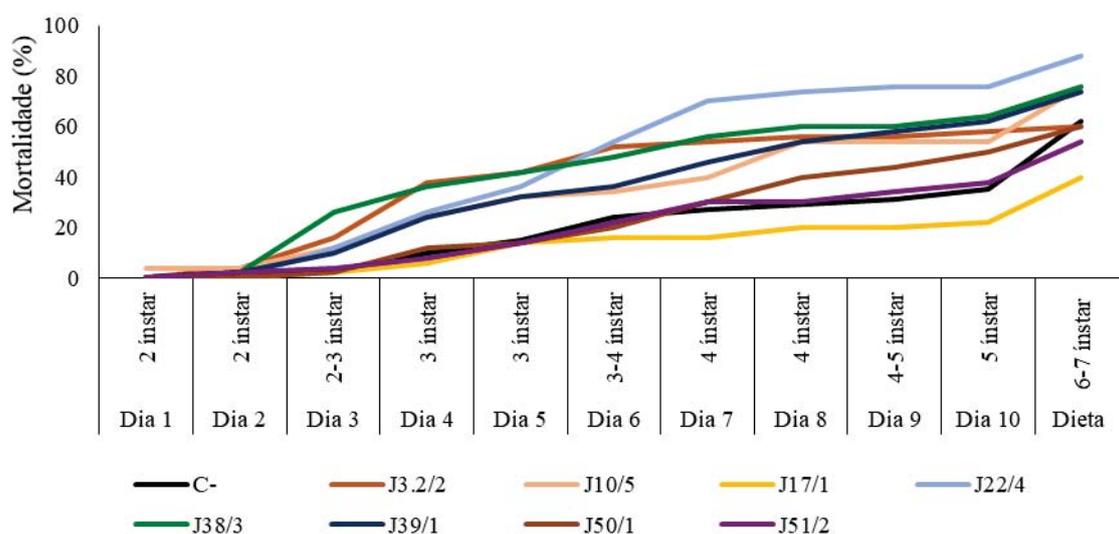
Figura 24 - Mortalidade acumulada das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas por dez dias com plantas transgênicas de tabaco contendo a construção para expressão da proteína entomotóxica Jaburetox e após transferência para dieta artificial por mais dez dias. Passo Fundo, 2018



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=50) ± desvio padrão. As mesmas letras sobre as colunas não diferem estatisticamente pelo teste Duncan (p<0,05). C- = Controle negativo.

Na avaliação da mortalidade acumulada ao longo do experimento foi possível verificar que não houve picos com maior frequência de mortalidade, sendo que esta ocorreu ao longo do desenvolvimento das larvas, inclusive após a transferência das larvas para dieta artificial (Figura 25). O JBTX, diferentemente do RNAi, possui efeito entomotóxico residual, apresentando efeitos de toxicidade nas larvas mesmos após o cessamento da exposição a toxina (DIDONÉ, 2018).

Figura 25 - Mortalidade acumulada ao longo do experimento com larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas por dez com plantas transgênicas de tabaco portando o gene para expressão da proteína entomotóxica JBTX mais dez dias em dieta artificial. Passo Fundo, 2018



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=50). C- = Controle negativo.

Para melhor visualização dos dados de mortalidade dos tratamentos foi calculada a mortalidade efetiva que compreende o resultado da mortalidade dos tratamentos subtraída a mortalidade dos tratamentos. (Tabela 6). O evento J22/4 causou a maior mortalidade efetiva (26%) comparada aos outros eventos.

Tabela 6 - Mortalidade acumulada e mortalidade efetiva das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com plantas transgênicas de tabaco contendo o gene para expressão da proteína entomotóxica JBTX. Passo Fundo, 2018

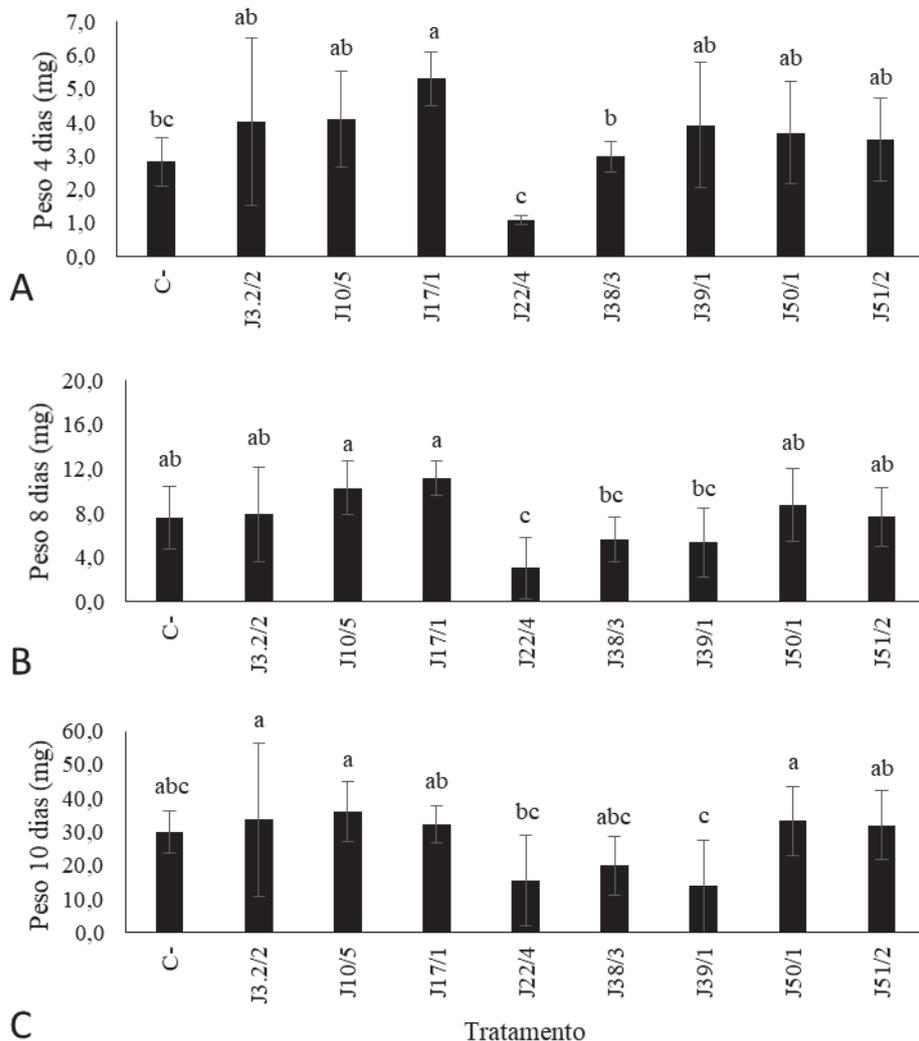
Tratamentos	Mortalidade acumulada (%)	Mortalidade efetiva (%) ¹
C-	62	
J3.2/2	60	-2
J10/5	76	14
J17/1	40	-20
J22/4	88	26
J38/3	76	14
J39/1	74	12
J50/1	60	-2
J51/2	54	-8

(1) Mortalidade tratamento – mortalidade controle
 C- = Controle negativo

Foram realizadas pesagens aos quatro, oito e dez dias de experimento. Na avaliação de peso aos 4 dias de experimento as larvas alimentadas com o evento J17/1 apresentaram maior peso em relação ao controle, os demais tratamentos não diferiram estatisticamente do controle (Figura 26 A). Na avaliação de peso aos 8 dias, as larvas alimentadas com o evento J22/4 apresentaram o menor peso (Figura 26 B). Já na avaliação aos 10 dias, os tratamentos não diferiram do controle (Figura 26 C).

Um dos efeitos entomotóxicos do JBTX é a ação nos túbulos de Malpighi afetando a diurese dos insetos e resultando na retenção de líquidos e toxinas e consequentemente aumentando o peso dos insetos (CARLINI et al., 1997). Este fato pode explicar o aumento de peso observado aos 4 dias nas larvas alimentadas com o evento J17/1 e a ausência da redução do peso das larvas na maioria dos tratamentos.

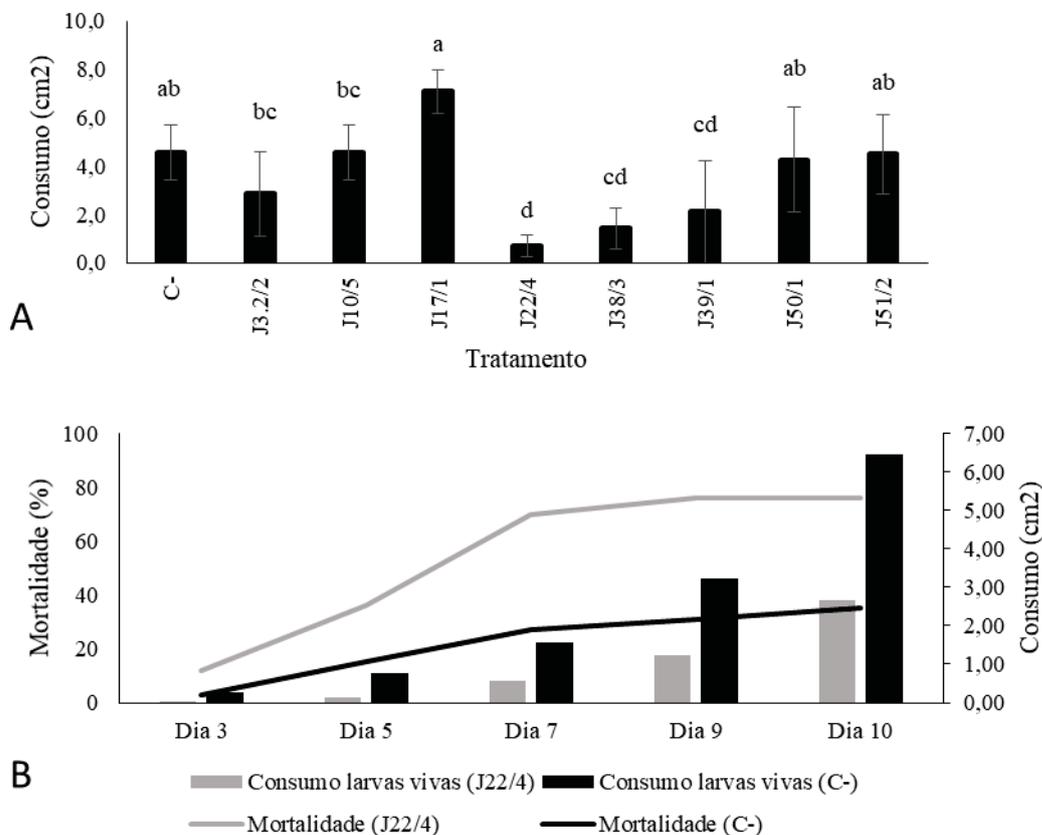
Figura 26 - Peso médio das larvas de *Helicoverpa armigera* aos 4 (A), 8 (B) e 10 (C) dias de experimento, alimentadas com plantas transgênicas de tabaco portadoras do gene para expressão da proteína entomotóxica JBTX. Passo Fundo, 2018



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=50) \pm desvio padrão. As mesmas letras sobre as colunas não diferem estatisticamente pelo teste Duncan ($p < 0,05$). C- = Controle negativo.

As larvas alimentadas com as plantas J22/4, J38/3 e J39/ consumiram, em média, 0,7, 1,4 e 2,1 cm^2 , respectivamente. Estes valores representam um consumo 6, 3 e 2 vezes menor que as larvas do controle (4,5 cm^2) (Figura 27A). Larvas alimentadas com estas plantas também apresentaram maior mortalidade ao final dos dez dias de experimento, reafirmando a relação entre consumo e mortalidade. O emprego destas plantas numa situação de campo poderia resultar no aumento da proteção contra danos resultantes do ataque do inseto-praga *H. armigera*.

Figura 27 - Consumo médio total das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com discos foliares das plantas geneticamente modificadas para a expressão da proteína entomotóxica Jaburetox (A); consumo médio das larvas sobreviventes e mortalidade do evento J22/4 contendo o gene para expressão da proteína entomotóxica JBTX em relação ao controle negativo (B). Passo Fundo, 2018

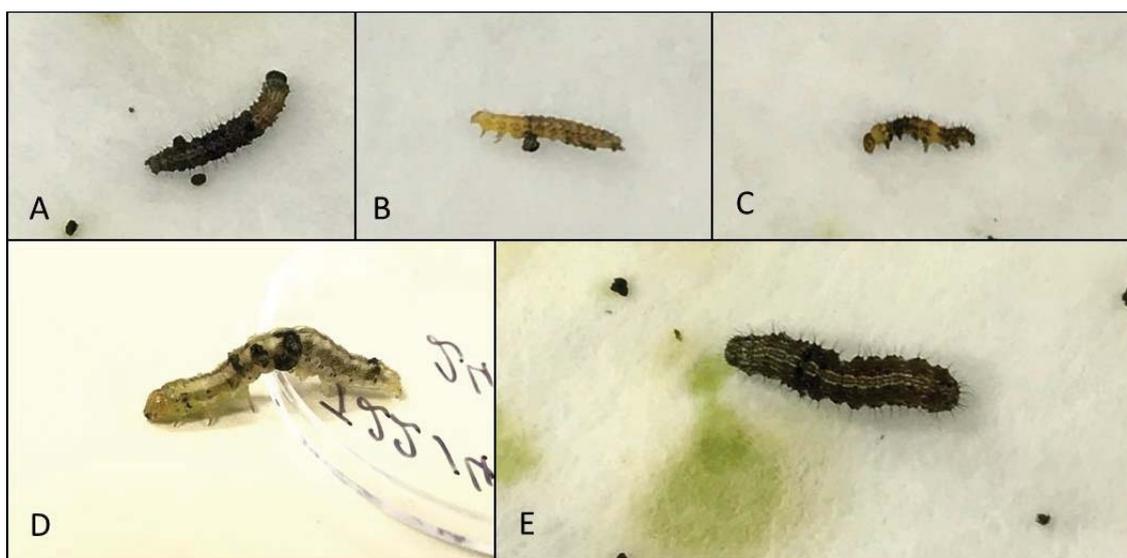


Os valores indicam a média do tratamento (n=50) ± desvio padrão. As mesmas letras sobre as colunas não diferem estatisticamente pelo teste Duncan (p<0,05). C-=controle negativo.

A figura 27 B mostra o consumo médio acumulado por larva viva e a mortalidade das larvas alimentadas com a planta J22/4 e com plantas controles ao longo dos dez dias de experimento. Essa figura retrata o comportamento alimentar das lagartas vivas ao longo do experimento, informando a taxa de mortalidade ao longo do mesmo. As lagartas vivas se alimentaram menos dos discos foliares da planta J22/4 comparado com as lagartas alimentadas com o controle. O peptídeo JBTX, além de induzir a morte das lagartas, reduz o apetite das lagartas sobreviventes. Isso pode ser considerado uma vantagem na proteção de plantas.

Foram observados, durante a execução dos experimentos, alterações morfológicas nos insetos alimentados com as plantas portando o gene para expressão da proteína entomotóxica JBTX. Estas alterações estavam relacionadas especialmente a malformações durante a ecdise, presença de sulcos no tegumento e encurtamento das larvas geralmente precedida da mortalidade (Figura 28). Estudos recentes demonstraram que o JBTX interfere na enzima quitina sintetase (FRUTTERO et al., 2017). A ausência ou alteração na produção da enzima responsável pela produção de quitina pode interferir na ecdise, ocasionando a não liberação da cutícula antiga além de causar sulcos no tegumento das larvas (DIDONÉ, 2018).

Figura 28 - Alterações morfológicas visualizadas nas larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com as plantas de tabaco contendo o gene para expressão da proteína entomotóxica JBTX. A) a C) ocorrência de malformações durante a ecdise com retenção da antiga cutícula; D) presença de sulcos no tegumento e, E) encurtamento das larvas. Passo Fundo, 2018



De acordo com os resultados obtidos nos bioensaio com as plantas contendo os genes para expressão do hpRNA-*rieske* e da proteína entomotóxica JBTX foram selecionados os três melhores eventos de cada uma das construções visando o empilhamento gênico e obtenção de plantas contendo e expressando ambas substâncias inseticidas. O perfil dos eventos selecionados R12/2, R32/2, R2/2, J22/4, J38/3 e J39/1 que foram selecionados para a realização de cruzamentos recíprocos entre as plantas hpRNA-*rieske* x JBTX e JBTX x hpRNA-*rieske* é mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Perfil dos eventos transgênicos hpRNA-*rieske* e JBTX selecionados quanto a mortalidade acumulada e efetiva, peso e redução do consumo em relação ao controle negativo das larvas de *Helicoverpa armigera* visando o empilhamento gênico. Passo Fundo, 2018

Tratamentos	Mortalidade acumulada (%)	Mortalidade efetiva (%) ¹	Peso (g)			Redução do consumo (%)
			4 dias	8 dias	10 dias	
<i>hpRNA-rieske</i>						
C-	64		1,4	-	-	-
R2/2	98	34	1,6	-	-	-73,6
R12/2	100	36	0,7	-	-	-96,9
R32/2	100	36	0,7	-	-	-92,2
<i>JBTX</i>						
C-	62		2,8	7,6	30,0	-
J22/4	88	26	1,1	3,1	15,5	-84,4
J38/3	76	14	3,0	5,6	19,9	-68,6
J39/1	74	12	3,9	5,4	13,9	-53,6

(1) Mortalidade tratamento – mortalidade controle

– Expressão gênica do gene *rieske* em larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com plantas transgênicas de tabaco hpRNA-*rieske*

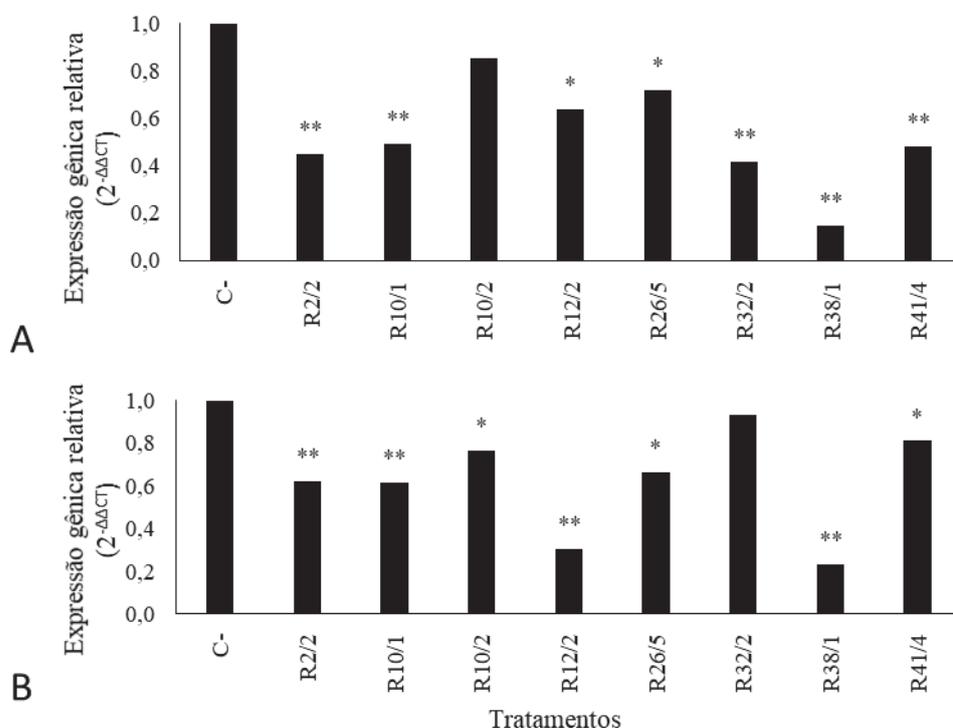
A construção gênica do hpRNA-*rieske* inserido nas plantas de tabaco visa reduzir o nível de transcritos do gene *rieske* nas larvas de *H. armigera*, pela inativação do RNAm desse gene mediante o mecanismo de RNA de interferência. Assim, a mortalidade das larvas alimentadas com os eventos transgênicos seria resultado da redução da expressão gênica a nível pós-transcricional do gene *rieske*. O gene *rieske* codifica para a proteína Iron-sulfur que compõe o citocromo bc-1 e participa da cadeia de respiratória de transporte de elétrons da mitocôndria. O RT-qPCR foi empregado para verificar o nível de expressão deste gene nas larvas tratadas com as plantas geneticamente modificadas hpRNA-*rieske*.

A avaliação do nível de expressão do gene *rieske* foi analisada no terceiro ínstar devido à alta expressão deste gene neste período (CECCON, 2016). Os resultados da expressão relativa do gene *rieske* nas larvas *H. armigera* alimentadas com as plantas transgênicas portando o gene para expressão do hpRNA-*rieske* confirmam a ocorrência

de silenciamento gênico nos tecidos do sistema digestório e nos tecidos do restante do corpo (Figura 29).

A redução da expressão do gene *rieske* no sistema digestório variou de 15% nas lagartas alimentadas com a planta R10/2 à 85% nas alimentadas com a planta R38/1 (Figura 29 A). Enquanto nos tecidos do restante do corpo o silenciamento gênico variou de 20% nas lagartas alimentados com a planta R41/4 a 75% nas alimentadas com a planta R38/1 (Figura 29 B).

Figura 29 - Expressão gênica relativa do gene *rieske* no A) sistema digestório e, B) tecidos do restante do corpo das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com plantas de tabaco geneticamente modificadas contendo a construção para expressão do hpRNA-*rieske*. Passo Fundo, 2018



Nota: Teste T Student * $p > 0,05$, ** $p > 0,01$. C- = controle negativo.

O evento R12/2, que causou 100% de mortalidade em seis dias de experimento, reduziu o nível de transcritos em 36% no sistema digestório e 70% nos tecidos do restante do corpo das larvas de *H. armigera* de terceiro ínstar. O baixo silenciamento no sistema digestório das larvas alimentadas com este evento pode ter ocorrido devido ao baixo consumo das larvas no período de troca de segundo para terceiro ínstar e da redução na

alimentação ocorrido antes da mortalidade, uma vez que todas as lagartas estavam mortas até o terceiro ínstar. Porém a ocorrência de 70% de silenciamento nos tecidos do restante do corpo indicam que os efeitos letais e subletais observados são decorrentes da redução do nível de transcritos do gene *rieske* nas larvas alimentadas com o evento R12/2.

A efetividade do silenciamento do gene *rieske* em tecidos do restante do corpo comprova a ocorrência de RNAi sistêmico em insetos, ou seja, o mecanismo em que o silenciamento por RNAi se amplifica das células em que o RNAdf foi originalmente produzido ou captado (WHANGBO; HUNTER, 2008). Devido a ausência da enzima RdRp, que facilitaria a propagação do sinal de silenciamento, os insetos podem utilizar outros mecanismos, ainda não totalmente elucidados, que possibilitam a propagação do sinal de silenciamento para outras células. Porém, é necessário que a alimentação com as moléculas indutoras do silenciamento seja contínua para que os resultados de RNAi sistêmico sejam efetivamente observados (ZHANG et al., 2013; LIM et al., 2016).

A efetividade da utilização de plantas transgênicas expressando hpRNA/siRNA na indução do silenciamento e manifestação de mortalidade e efeitos subletais tem sido demonstrado para insetos-praga de diferentes ordens, como lepidópteros, coleópteros e hemípteros (BAUM et al., 2007; MAO et al., 2007, PITINO et al., 2011; MAO; ZHENG, 2013; THAKUR et al., 2014, HAN et al., 2017).

Foi observado que o hpRNA expresso em planta é parcialmente processado em siRNA pela planta Dicer antes de ser ingerido por insetos (PITINO et al., 2011; ZHA et al., 2011). Porém, o hpRNA não processado pela Dicer da planta tem mostrado uma resposta de RNAi mais efetiva comparado ao siRNA processado pela planta hospedeira (LIM et al., 2016). Dessa forma, as plantas com maior expressão de hpRNA e conseqüentemente, maior presença de moléculas de hpRNA na planta a ser ingerida pelo inseto, podem apresentar melhores resultados de silenciamento gênico e efeitos letais e subletais nas larvas.

A presença de nucleases no intestino das larvas de lepidópteros (GAR BUTT et al., 2012; LIU et al., 2012) e a ocorrência de silenciamento sistêmico, porém transiente (LIM

et al., 2016) demandam a alimentação contínua com altas doses das moléculas iniciadoras do silenciamento gênico. Portanto, a utilização de plantas transgênicas expressando o hpRNA seriam a alternativa para a disponibilização contínua das moléculas desencadeadoras do silenciamento via RNAi.

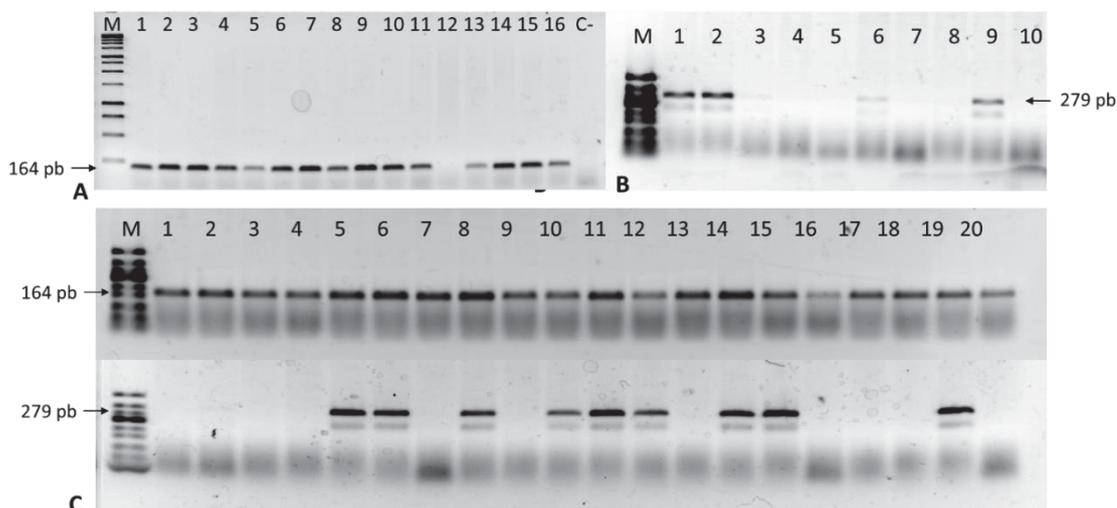
A utilização de plantas para a disponibilização oral das moléculas iniciadoras do silenciamento gênico apresenta melhores resultados quando comparados a disponibilização de moléculas sintetizadas *in vitro*. A aplicação tópica do RNA dupla fita referente a parte do gene *rieske* (RNAdf-*rieske*) em discos foliares causou 13% de mortalidade e cerca de 30% de silenciamento no sistema digestório das larvas de *H. armigera* (CECCON, 2016). Já no presente trabalho, a alimentação com plantas GM contendo o gene para expressão do hpRNA-*rieske* se mostrou muito superior no nível de redução de transcritos e consequente mortalidade das larvas.

4.3.2 Empilhamento gênico: cruzamento das plantas transgênicas hpRNA-*rieske* e Jaburetox

Foi possível a obtenção de sementes viáveis a partir de todos os 18 cruzamentos recíprocos realizados entre as plantas selecionadas hpRNA-*rieske*: R12/2, R32/2, R2/2 e JBTX: J22/4, J38/3 e J39/1 (ver tabela 3 do material e métodos).

Os cruzamentos recíprocos R12/2xJ22/4 e J22/4xR12/2 juntamente com a geração R2 dos parentais R12/2 (portador do gene hpRNA-*rieske*) e J22/4 (portador do gene *JBTX*) foram selecionadas para serem avaliadas em bioensaios com o inseto alvo. As sementes foram semeadas em casa de vegetação e foram coletadas amostras para extração de DNA e análise de PCR para detecção da presença de ambos genes de interesse nos híbridos e avaliação da geração R2 dos parentais R12/2 e J22/4 (Figura 30).

Figura 30 - PCR convencional da geração R2 das plantas de transgênicas de tabaco utilizadas como genitoras e seus híbridos: A) progênie R2 do genitor R12/2, B) progênie R2 do genitor J22/4 e C) vinte plantas híbridas resultantes do cruzamento entre os genitores R12/2xJ22/4. Passo Fundo, 2018



De acordo com os dados de PCR (Tabela 8) há a possibilidade de que o evento R12/2 está em homozigose, visto que quase 100% dos híbridos e das plantas autofecundadas apresentavam o gene para o hpRNA-*rieske*. Porém, há também a possibilidade da inserção de múltiplas cópias dos genes que poderiam fornecer resultados semelhantes de segregação do transgenes. Por outro lado, os resultados apontam para a hipótese de que a planta genitora do *JBTX* (J22/4) está em heterozigose, pois o gene foi repassado para aproximadamente 50% da progênie, tendo uma segregação de 3:1 quando autofecundada.

Tabela 8 - Resultado da análise de PCR para detecção da presença dos genes de interesse hpRNA-*rieske* e *Jaburetox* nas plantas de tabaco resultantes dos cruzamentos recíprocos visando o empilhamento gênico e da autofecundação dos genitores. Passo Fundo, 2018

Híbridos recíprocos	Plantas coletadas (n)	Plantas PCR + hpRNA- <i>rieske</i> (n)	Plantas PCR + <i>JBTX</i> (n)
R12/2xJ22/4	30	30	14
J22/4xR12/2	30	29	13
Parentais R2	Plantas coletadas (n)	Plantas PCR + hpRNA- <i>rieske</i> (n)	Plantas PCR + <i>JBTX</i>
R12/2	16	15	-
J22/4	10	-	4

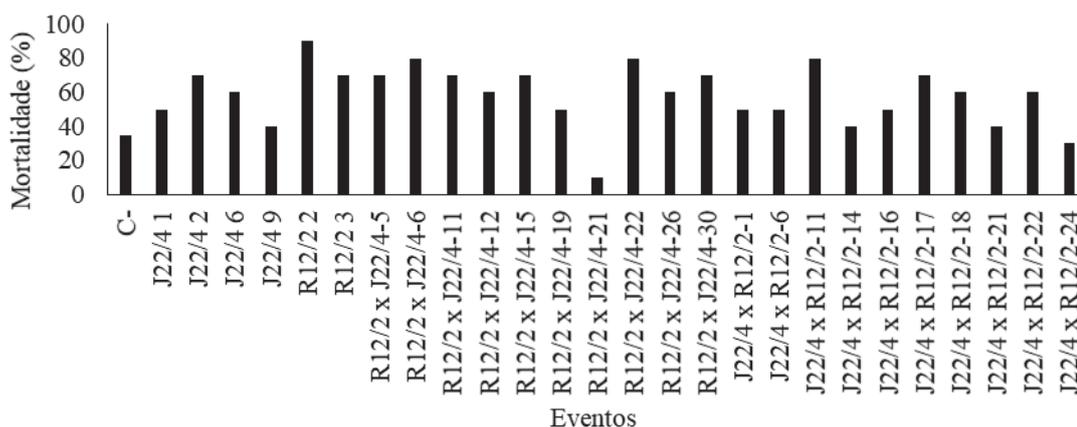
Das plantas PCR positivas, foram selecionadas 10 plantas de cada um dos cruzamentos R12/2xJ22/4 e J22/2xR12/2, além de duas plantas R12/2 e quatro plantas J22/4, somadas a três plantas controle negativo para a realização do pré-bioensaio com o inseto alvo.

– **Pré-bioensaio das plantas transgênicas empilhadas com *Helicoverpa armigera***

Visando avaliar as plantas empilhadas com as duas tecnologias no controle de *H. armigera* foram avaliadas a mortalidade, o peso, o consumo e o tamanho das larvas de segundo ínstar alimentadas com os híbridos de tabaco e com os parentais.

A mortalidade das larvas ao final dos oito dias de experimento variou entre 10 e 90% (Figura 31), sendo que as maiores taxas de mortalidade foram verificadas nas lagartas alimentadas com segmentos foliares do parental R12/2 (90%) e das plantas híbridas R12/2xJ22/4-6, R12/2xJ22/4-22 e J22/4xR12/2-11 (80%). A mortalidade das larvas alimentadas com plantas controles não transgênicos foi de 30%.

Figura 31 - Mortalidade das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas, durante oito dias, com segmentos foliares de tabaco geneticamente modificado com genes para expressão do hpRNA-*rieske* e da proteína entomotóxica Jaburetox. Passo Fundo, 2018

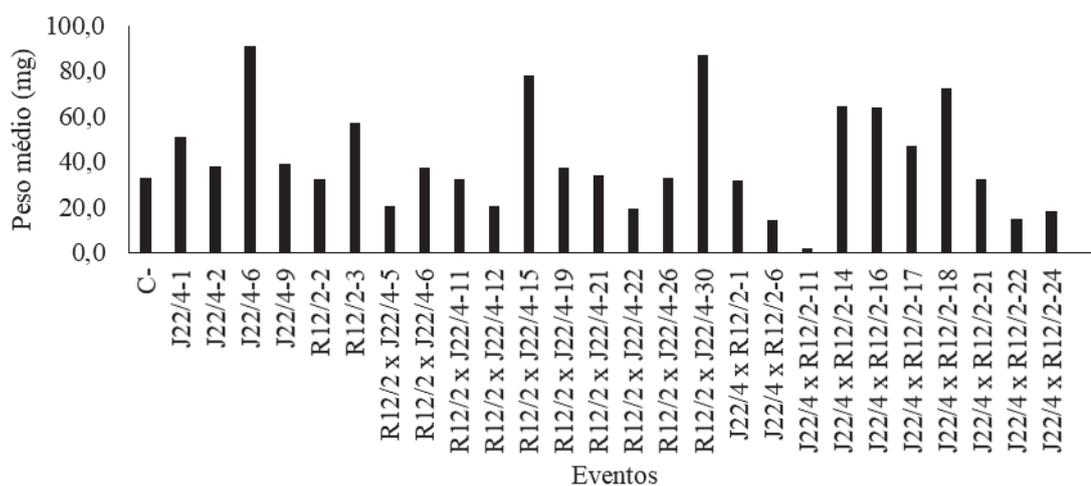


Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=10). C- = Controle negativo.

O peso médio das lagartas vivas ao final dos oito dias de experimento variou de 2 a 90 mg, sendo que as larvas alimentadas com o evento J22/4xR12/2-11 apresentaram o menor peso, sendo 15 vezes menor que o controle (30 mg) (Figura 32).

Novamente, é possível observar a grande variação de resposta das larvas de *H. armigera* à alimentação com plantas irmãs resultantes do mesmo evento ou do mesmo cruzamento, ressaltando que variações na expressão dos transgenes podem estar interferindo na eficiência das plantas em causar mortalidade e efeitos subletais nas larvas.

Figura 32 - Peso médio das larvas vivas de *Helicoverpa armigera* alimentadas, durante oito dias, com segmentos foliares de tabaco geneticamente modificado para a expressão do hpRNA-*rieske* e da proteína entomotóxica Jaburetox. Passo Fundo, 2018



Os valores indicam a média do tratamento (n=10). C- = Controle negativo.

O tamanho e consumo das larvas foram avaliados de acordo com a escala de notas de 1 a 4 (Figura 33). O menor consumo foi observado nas larvas alimentadas com a planta J22/4xR12/2-11 (Figura 34). Da mesma forma, as larvas alimentadas com este evento foram as que apresentaram menor peso (Figura 35).

Figura 33 - Escala de notas utilizada para avaliação do A) tamanho e, B) consumo de área foliar das larvas alimentadas com plantas de tabaco geneticamente modificado contendo os genes *hpRNA-rieske* e *Jaburetox* e plantas empilhadas contendo ambos os genes. Passo Fundo, 2018

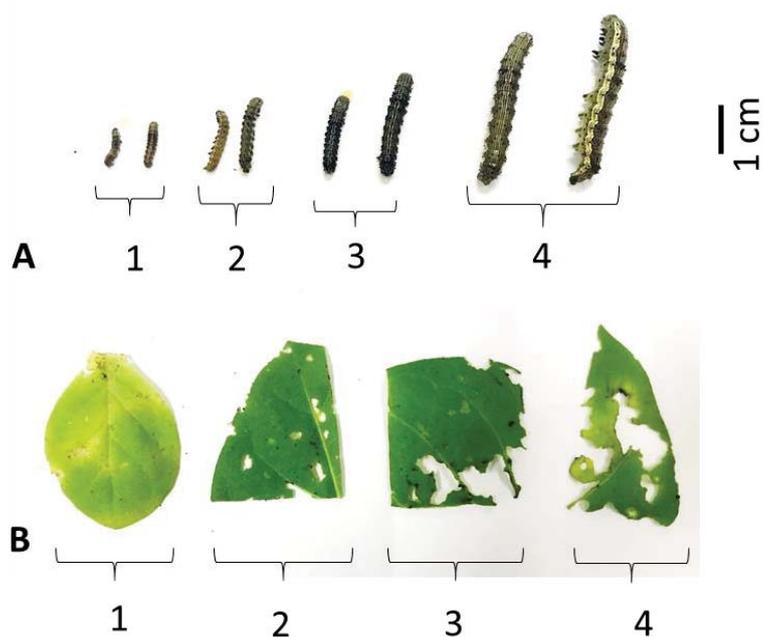
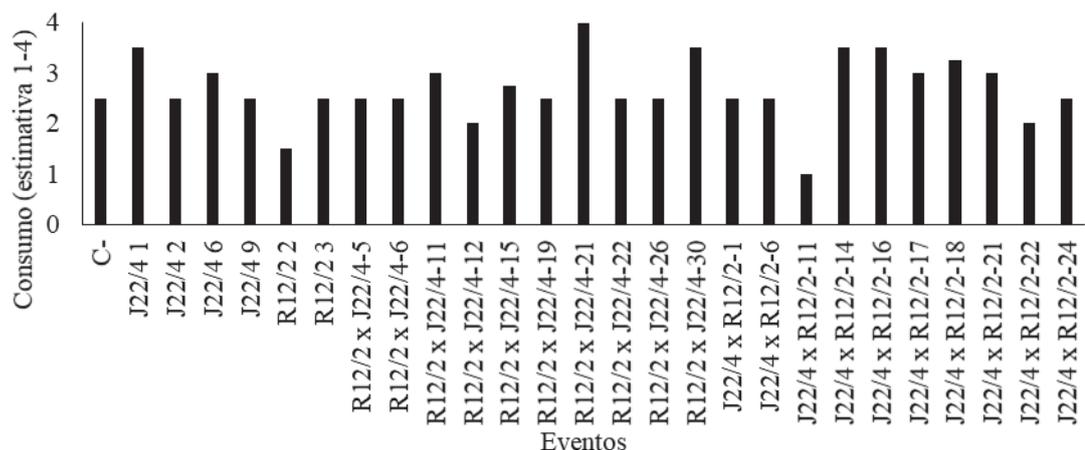
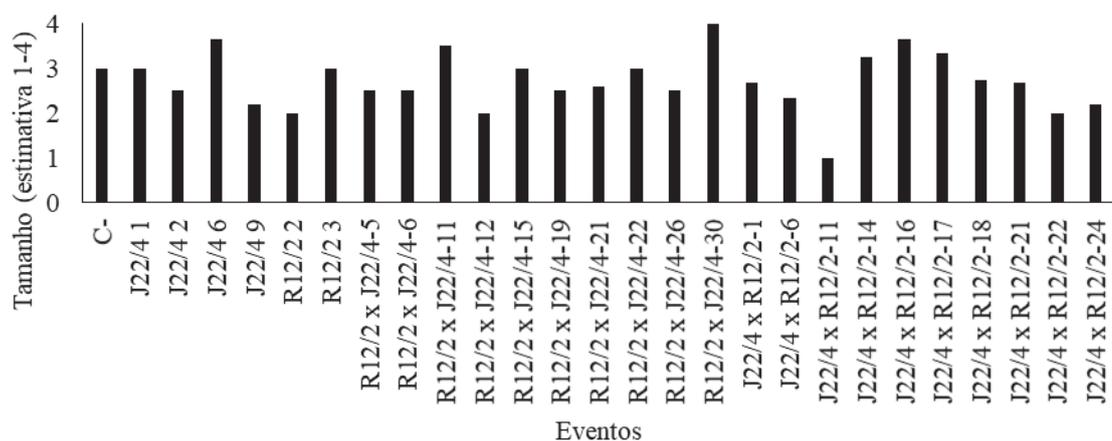


Figura 34 - Estimativa de consumo de área foliar das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas, durante oito dias, com plantas de tabaco geneticamente modificadas contendo os genes *hpRNA-rieske* e *Jaburetox* e plantas empilhadas contendo ambos os genes. Passo Fundo, 2018



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=10). C- = controle negativo.

Figura 35 - Estimativa de tamanho das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas, durante oito dias, com plantas geneticamente modificadas contendo os genes *hpRNARieske* e *Jaburetox* e plantas empilhadas contendo ambos os genes. Passo Fundo, 2018



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=10). C- = controle negativo.

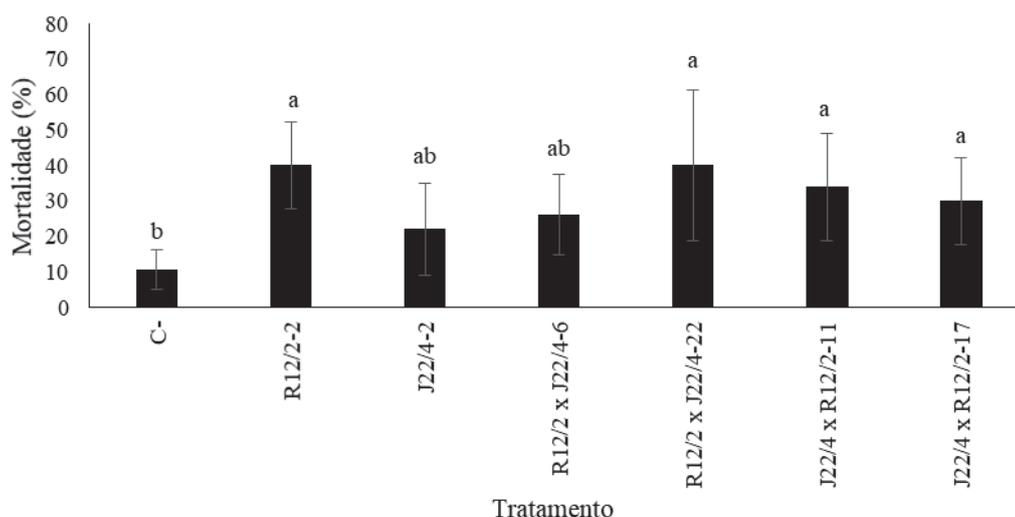
Considerando os dados obtidos, principalmente em relação a mortalidade, foram selecionados quatro híbridos empilhados de tabaco para a realização do bioensaio: R12/2xJ22/4-6, R12/2xJ22/4-22, J22/4xR12/2-11 e J22/4xR12/2-17. Os parentais selecionados foram J22/4-2 e R12/2-2.

– **Bioensaio das plantas transgênicas empilhadas com *Helicoverpa armigera***

Enquanto as larvas estavam sendo mantidas sob alimentação de discos foliares das plantas transgênicas as maiores mortalidades foram verificadas nas larvas alimentadas com as plantas contendo somente o gene para expressão do hpRNA-*rieske* R12/2-2 (parental) e com os híbridos empilhados contendo ambos os genes R12/2xJ22/4-22, J22/4xR12/2-11 e J22/4xR12/2-17 (30 a 40% de mortalidade) quando comparadas com o controle (10%) (Figura 36).

A elevada mortalidade do evento simples R12/2-2 verificada no pré-bioensaio e no bioensaio provavelmente é devido à possibilidade do gene estar em homozigose na planta, que além de trazer maior estabilidade, possivelmente aumenta a expressão dos transgenes.

Figura 36 - Mortalidade das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com discos foliares de eventos simples de tabaco contendo os genes para expressão do hpRNA-*rieske* e da proteína entomotóxica Jaburetox e eventos empilhados contendo os genes para expressão de ambas substâncias inseticidas. Passo Fundo, 2019

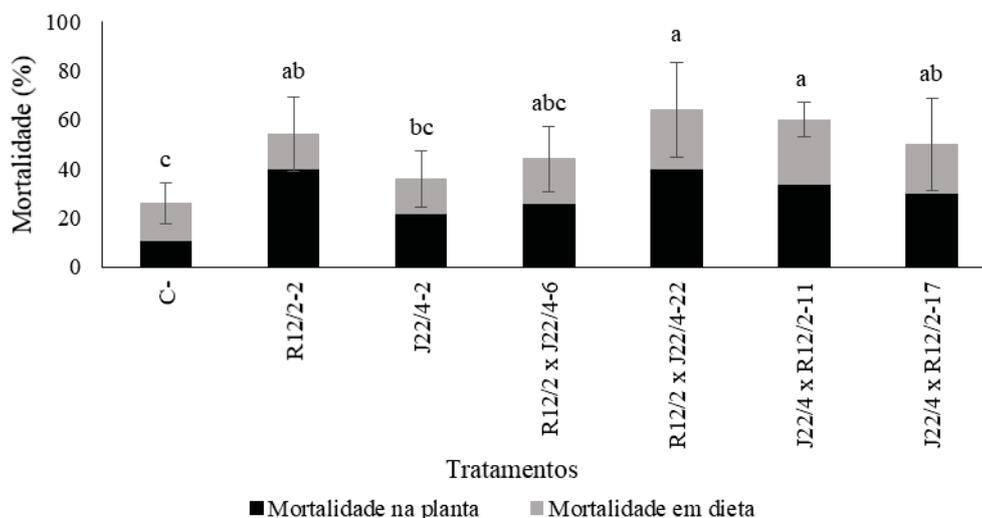


Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=50) ± desvio padrão. As mesmas letras sobre as colunas não diferem estatisticamente pelo teste Duncan (p<0,05).

Considerando a mortalidade acumulada, ou seja, a mortalidade observada durante o período em que as larvas se alimentavam das plantas transgênicas somada a mortalidade observada quando as mesmas foram transferidas e mantidas por dez dias em dieta livre de substâncias inseticidas, as plantas R12/2-2, R12/2xJ22/4-22, J22/4xR12/2-11 e J22/4xR12/2-17 também tiveram maior mortalidade em relação ao controle (Figura 37).

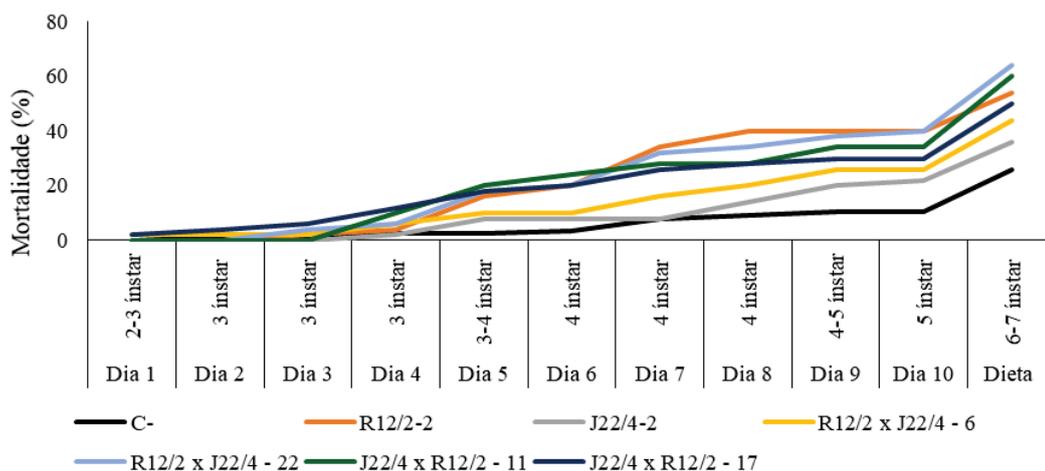
A análise da mortalidade acumulada permite verificar que enquanto as larvas estavam sendo alimentadas com discos foliares das plantas transgênicas não houve picos de com alta frequência de mortalidade, padrão semelhante ao observado no experimento com as plantas R1 contendo o gene para expressão da proteína entomotóxica JBTX, sendo que esta ocorreu de forma uniforme a partir do terceiro ínstar das larvas (Figura 38).

Figura 37 - Mortalidade acumulada das larvas de *Helicoverpa armigera* enquanto estavam sendo alimentadas com eventos simples de tabaco contendo os genes para expressão do hpRNA-*rieske* e da proteína entomotóxica Jaburetox e eventos empilhados contendo os genes para expressão de ambas substâncias inseticidas e após transferência de todos os tratamentos para dieta artificial. Passo Fundo, 2019



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=50) ± desvio padrão. As mesmas letras sobre as colunas não diferem estatisticamente pelo teste Duncan (p<0,05). C-= controle negativo.

Figura 38 - Mortalidade acumulada das larvas de *Helicoverpa armigera* enquanto estavam sendo alimentadas com eventos simples contendo os genes para expressão do hpRNA-*rieske* e da proteína entomotóxica Jaburetox e eventos empilhados contendo os genes para expressão de ambas substâncias inseticidas e após transferência de todos os tratamentos para dieta artificial. Passo Fundo, 2019



Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=50). C-= controle negativo.

Quando as larvas foram transferidas para dieta, houve um acentuado aumento na mortalidade de todos os tratamentos, inclusive do controle (Figura 37). Para melhor visualização da mortalidade dos tratamentos foi realizado o cálculo de mortalidade efetiva, que é resultante da subtração da mortalidade dos tratamentos e da mortalidade do controle (Tabela 9).

Tabela 9 - Mortalidade acumulada e efetiva das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com eventos simples de tabaco contendo os genes para expressão do hpRNA-*rieske* e da proteína entomotóxica JBTX e eventos empilhados contendo os genes para expressão de ambas substâncias inseticidas. Passo Fundo, 2019

Tratamentos	Mortalidade acumulada (%)	Mortalidade efetiva (%) ¹
C-	26	
R12/2-2	54	28
J22/4-2	36	10
R12/2xJ22/4-6	44	18
R12/2xJ22/4-22	64	38
J22/4xR12/2-11	60	34
J22/4xR12/2-17	50	24

(1) Mortalidade tratamento – mortalidade controle
C- = Controle negativo

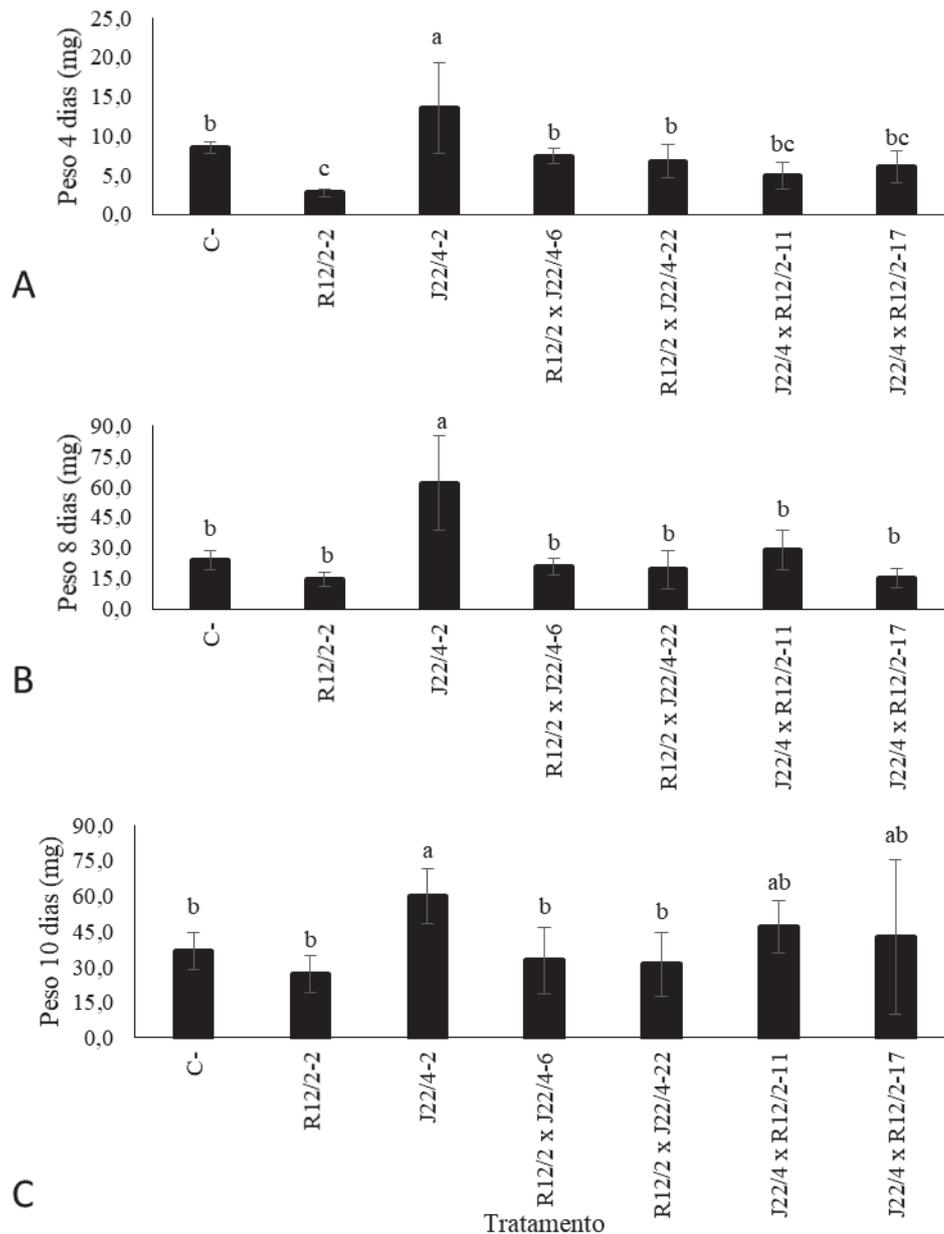
A mortalidade observada durante o período de dieta, a qual não continha substâncias entomotóxicas, pode ser devido a diversos fatores da biologia da lagarta e da própria dieta. Da mesma forma, as plantas de tabaco podem não suprir as necessidades nutricionais das larvas de *H. armigera* ou também pode ser efeito residual da proteína

entomotóxica JBTX uma vez que já foi verificado a ocorrência de mortalidade em larvas de *H. armigera* mesmo após a exposição ao peptídeo JBTX purificado (DIDONÉ, 2018).

Em relação ao peso, aos 4 dias de experimento, as larvas alimentadas com as plantas R12/2-2 apresentaram menor peso em relação ao controle e as larvas alimentadas com a planta J22/4-2 apresentaram maior peso, os demais tratamentos não diferiram do controle (Figura 39 A). Aos 8 (Figura 39 B) e aos 10 (Figura 39 C) dias de experimento as larvas alimentadas com a planta J22/4 apresentaram o maior peso e os demais tratamentos não diferiram do controle.

O maior peso observado nas larvas alimentadas com a planta J22/4 pode ser decorrente do efeito antidiurético do JBTX, que ao inibir a diurese pode causar o aumento no peso das larvas (CARLINI et al., 1997).

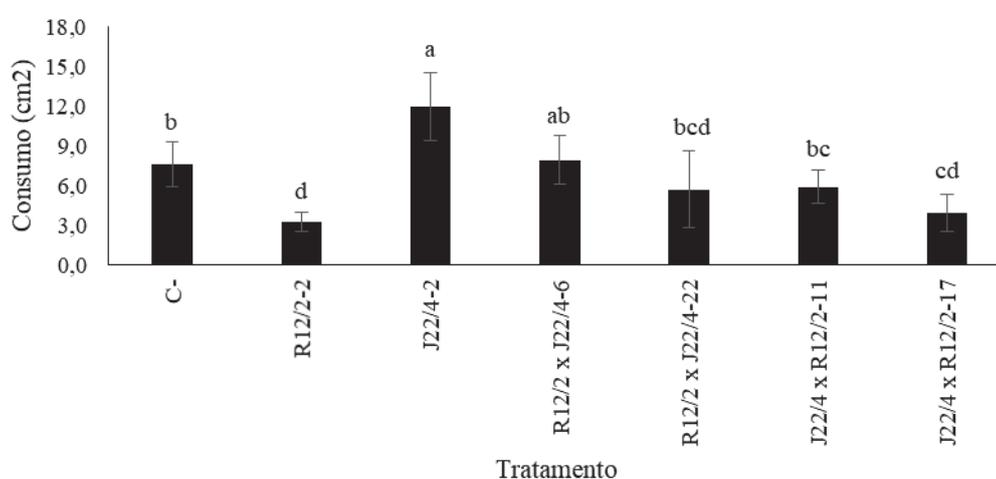
Figura 39 - Peso médio das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com eventos simples de tabaco contendo os genes para expressão do hpRNA-*rieske* e da proteína entomotóxica Jaburetox e eventos empilhados contendo os genes para expressão de ambas substâncias inseticidas aos 4 (A), 8 (B) e 10 (C) dias de experimento. Passo Fundo, 2019



As larvas alimentadas com a planta parental R12/2-2 e o híbrido J22/4xR12/2-17 foram as que apresentaram o menor consumo da área foliar ofertada durante os dez dias do experimento. O consumo das larvas alimentadas com as plantas R12/2-2 e J22/4xR12/2-17 foi 58 e 48% menor em relação ao controle, respectivamente (Figura 40), destacando a possibilidade da redução dos danos causados às plantas transgênicas numa situação de campo, devido ao menor consumo das larvas.

O consumo das larvas alimentadas com a planta J22/4-2 foi maior em relação ao controle (Figura 40). As larvas alimentadas com estas plantas também foram as que apresentam as menores taxa de mortalidade, não diferindo do controle e apresentaram o maior peso. O fato do evento J22/4 ainda estar segregando, estando em heterozigose, pode estar interferindo na expressão do transgene, afetando a eficiência das plantas filhas em causar a mortalidade e outros efeitos deletérios.

Figura 40 - Consumo médio total das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com discos foliares dos eventos simples contendo os genes para expressão do hpRNA-*rieske* e da proteína entomotóxica Jaburetox e eventos empilhados contendo os genes para expressão de ambas substâncias inseticidas. Passo Fundo, 2019

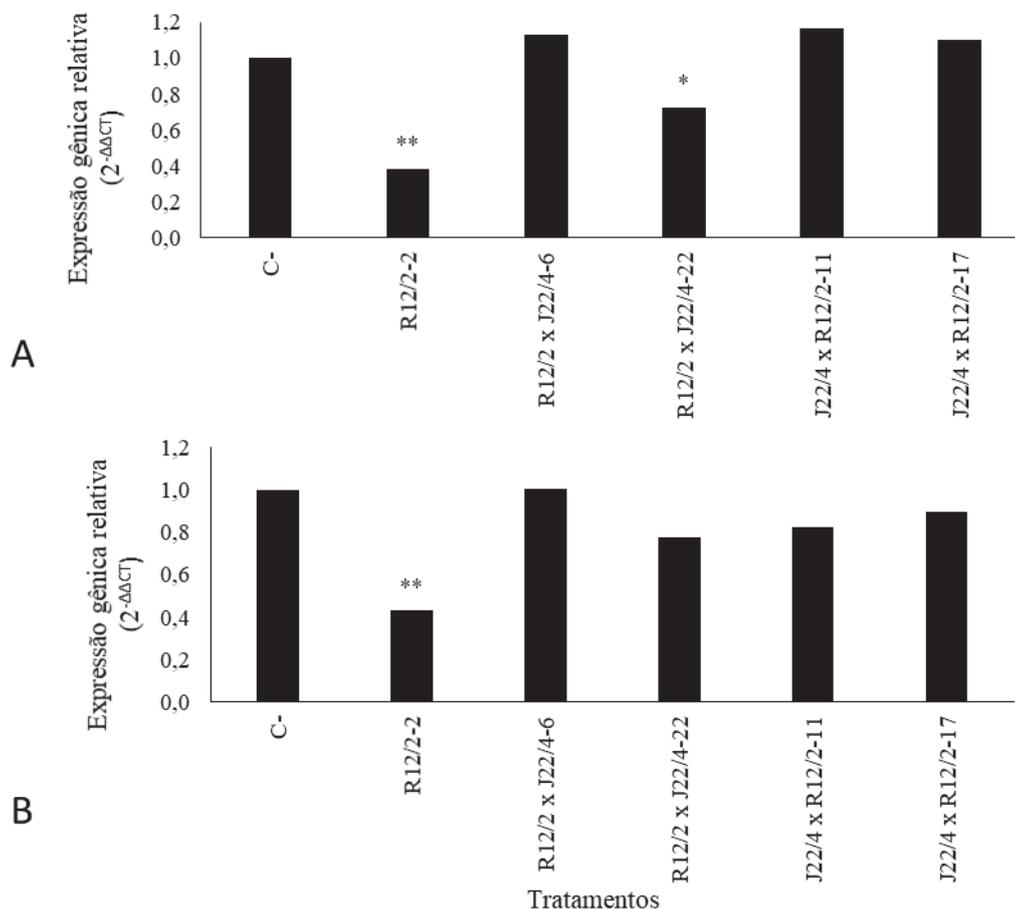


Nota: Os valores indicam a média do tratamento (n=50) ± desvio padrão. As mesmas letras sobre as colunas não diferem estatisticamente pelo teste Duncan (p<0,05). C-= controle negativo.

– **Expressão gênica do gene *rieske* de *Helicoverpa armigera* alimentadas com plantas transgênicas contendo o gene hpRNA-*rieske* em eventos simples e empilhados**

Foi verificado a redução da expressão do gene *rieske* no sistema digestório das larvas alimentadas com as plantas geneticamente modificadas R12/2-2 e R12/2xJ22/4-22, com 62 e 27% de silenciamento, respectivamente. Os demais tratamentos não diferiram do controle (Figura 41 A). Na avaliação da expressão do gene *rieske* no restante do corpo, foi verificado a redução de 57% na expressão nas larvas alimentadas com a planta R12/2-2. Os demais tratamentos não diferiram do controle (Figura 41 B).

Figura 41 - Expressão gênica relativa do gene *rieske* no A) sistema digestório e, B) tecidos do restante do corpo das larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com eventos simples contendo o gene para expressão do hpRNA-*rieske* e eventos empilhados contendo os genes para a expressão do hpRNA-*rieske* e da proteína entomotóxica JBTX. Passo Fundo, 2019



Nota: Teste T Student * $p > 0,05$, ** $p > 0,01$. C- = Controle negativo.

A ausência de silenciamento, tanto no sistema digestório quanto no restante do corpo observado nas larvas alimentadas com alguns dos eventos empilhados leva a propor a hipótese de que a presença e ação da proteína entomotóxica JBTX possa estar interferindo na absorção das moléculas de hpRNA-*rieske*/siRNA-*rieske* e/ou no processamento e eficiência do mecanismo de RNAi no corpo do inseto, uma vez que, o JBTX interfere em diversas atividades biológicas dos insetos e quanto a lepidópteros não temos dados concretos do modo de atuação desta proteína entomotóxica.

Mesmo na ausência de silenciamento na maioria dos híbridos empilhados e a ocorrência de heterozigose para ambos os genes nos híbridos, foi verificada alta taxa de mortalidade das larvas alimentadas com as plantas R12/4xJ22/4-22 e J22/4xR12/2-11, mostrando-se superiores ao controle e ao parental J22/4 porém, não sendo diferentes, estatisticamente do parental R12/2 (Figura 37). Estes dados sugerem que a avaliação de híbridos contendo ambos os genes em homozigose pode trazer melhores resultados quanto ao potencial de controle de *H. armigera*.

Para melhor relacionar os resultados de mortalidade e silenciamento do gene *rieske* nas larvas de *H. armigera* é necessário a avaliação do perfil de expressão do hpRNA-*rieske* e JBTX nas plantas transgênicas utilizados neste trabalho.

5 DISCUSSÃO

Os casos de resistência as tecnologias de controle utilizadas atualmente têm suscitado a necessidade de novas tecnologias para o controle de insetos-praga. As características de *Helicoverpa armigera* de adaptar-se a diferentes ambientes e hospedeiros (FITT, 1989; TAY et al., 2013), o grande potencial de dano, quando não controlada corretamente, e os casos já reportados de resistência de populações deste inseto a inseticidas e proteínas oriundos de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Arthropod Pesticide Resistance Database, 2019) ressaltam este inseto-praga como alvo de estudos de novas estratégias de controle.

Neste trabalho buscamos avaliar duas novas tecnologias para o controle de *H. armigera*: (1) tecnologia baseada no RNA de interferência (RNAi) visando, especificamente, silenciar o gene *rieske* do inseto alvo e, (2) nova biomolécula inseticida, o peptídeo recombinante Jaburetox (JBTX), derivado de uma das isoformas de urease de *Canavalia ensiformes* (feijão de porco).

O RNAi tem sido avaliado como uma tecnologia com grande potencial para a utilização no controle de insetos-praga (PRICE & GATEHOUSE, 2008). Porém, algumas das principais dificuldades encontradas são as diferenças na efetividade do silenciamento em diferentes espécies de insetos, a escolha do gene alvo do silenciamento e o método de disponibilização que realmente sejam efetivos na indução do silenciamento causando efeitos deletérios no inseto e que possam ser aplicados a campo (PRICE; GATEHOUSE, 2008; ZHANG e al., 2013; MAMTA; RAJAM, 2017).

Geralmente, após avaliação inicial dos genes com potencial de utilização como alvo de silenciamento para controle de insetos pragas, frequentemente realizada mediante a disponibilização oral ou por injeção de moléculas de RNA_{df} (~300 pb) ou RNAi (~25

pb) no inseto, o melhor método de disponibilização é a utilização de plantas geneticamente modificadas expressando as moléculas indutoras de silenciamento – hpRNA/siRNA (BAUM et al., 2007, UPADHYAY et al., 2011; XIONG et al., 2013; THAKUR et al., 2014; HAN et al., 2017).

Para *Diabrotica virgifera virgifera* foram testadas 290 diferentes moléculas de RNAsdf tendo como alvo 26 diferentes genes. Dos 290 alvos potenciais, 125 mostraram mortalidade significativa das larvas e/ou atraso no desenvolvimento, e 14 genes demonstraram redução nos níveis de transcritos e levaram ao atraso no desenvolvimento dos insetos ou à mortalidade. Após a avaliação inicial de diversos genes, Baum et al. (2007) produziram plantas transgênicas de milho expressando o hpRNA do gene *adenosina trifosfato vacuolar (V-ATPase)* e verificaram a redução dos danos nas raízes de milho causado por *D. virgifera virgifera* (BAUM et al., 2007).

Da mesma forma, a avaliação da mortalidade mediada por RNAi em *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) via administração oral de RNAsdf tendo como alvo os genes ortólogo *de actina*, *translocase ADP/ATP*, *α -tubulina*, *proteína ribossomal L9 (rpl9)* e *V-ATPaseA*, demonstrou diferentes graus de mortalidade. O RNAdf visando o silenciamento do gene *v-ATPaseA* foi mais eficaz (UPADHYAY et al., 2011) e por isso foi selecionado como alvo de silenciamento mediado pela administração via oral de plantas transgênicas de tabaco expressando hpRNA. Aos 8 dias de experimento utilizando disco foliares foi verificada mortalidade de 34–83% e redução de 62% no nível de transcritos (THAKUR et al., 2014).

Em *H. armigera* o *receptor de hormônio 3 (HR3)* foi selecionado como gene alvo do silenciamento mediado por RNAi. Quatro fragmentos diferentes cobrindo a sequência de codificação do gene *HaHR3* foram clonados no vetor L4440 para expressar RNAsdf em *E. coli*. O fragmento de silenciamento mais eficiente foi então clonado em um vetor de expressão vegetal para expressar do hpRNA em tabaco transgênico. Após cinco dias de alimentação com as plantas transgênicas a mortalidade das larvas variou de 22,5 a 29,65% e silenciamento de aproximadamente 85% após 60 horas de alimentação com as plantas transgênicas (XIONG et al., 2013). Quando a construção para expressão do

hpRNA- *HaHR3* foi utilizada para obtenção de plantas de algodão geneticamente modificadas e estas plantas foram testadas em *H. armigera* a mortalidade das larvas foi muito superior, chegando a 100% no quinto dia de experimento com larvas de terceiro ínstar (HAN et al., 2017).

O sucesso obtido no silenciamento de genes via RNAi pela disponibilização oral de moléculas de hpRNA/siRNA produzidas por plantas transgênicas, inclusive em insetos que apresentam recalcitrância a este mecanismo, pode ser decorrente da possibilidade de alimentação contínua das moléculas indutoras do silenciamento, que minimiza os efeitos de degradação destas moléculas no intestino dos insetos (SIJEN et al., 2001; PRICE; GATEHOUSE, 2008). Insetos da ordem Lepidoptera são naturalmente menos sensíveis ao mecanismo de RNAi quando comparado a insetos de outras ordens (TERENIUS et al., 2011). A utilização de plantas transgênicas expressando hpRNAs tem se mostrado efetiva no silenciamento causando efeitos letais e subletais em insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera (BAUM et al., 2007; MAO et al., 2007, MAO et al., 2011; ZHA et al., 2011; HAN et al., 2017). A utilização de plantas transgênicas para produção de hpRNA oferece a vantagem de produção de grandes quantidades das moléculas indutoras do silenciamento, expressão do hpRNA em toda a planta ou em tecidos específicos dependendo do tipo de promotor utilizado. Além disso, o ambiente hostil do intestino do inseto pode induzir a degradação de RNAdf/siRNA, portanto, maior quantidade de moléculas desencadeadoras do silenciamento resultarão em resultados mais efetivos (GAR BUTT et al., 2013; MAMTA et al., 2016).

O gene *rieske*, gene alvo do silenciamento no presente trabalho, codifica para a proteína Iron-sulfur, componente do citocromo bc-1, participando da cadeia de respiratória de transporte de elétrons 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).

A utilização do gene *rieske* como alvo do silenciamento via RNAi em *H. armigera* foi testado anteriormente pela aplicação tópica de moléculas de RNAdf complementares a parte do gene *rieske* de *H. armigera* sob discos foliares de soja (CECCON, 2016). As

moléculas de RNAdf causaram, aos 5 dias de experimento, 13% de mortalidade (10% de mortalidade acima do controle) e cerca de 30% de silenciamento no sistema digestório e tecidos do restante do corpo das larvas. Porém, a partir deste período a quantidade de RNAdf disponibilizado às larvas não foi o suficiente para manter a mortalidade e o silenciamento. Os dados são condizentes com outros resultados encontrados para lepidópteros, especialmente *H. armigera*, que reportam a ocorrência de silenciamento sistêmico, porém, transiente e que depende de disponibilização contínua e em altas doses para que os efeitos do silenciamento sejam mantidos (LIM et al., 2016, TERENIUS et al., 2011, SCOTT et al., 2013).

Larvas de segundo ínstar de *H. armigera* alimentadas com dieta artificial contendo 35 µg/g de RNAdf complementar ao gene *transferrina* (*HaTrf*-RNAdf) demonstraram redução de 99% dos transcritos deste gene nos insetos tratados em 12, 24 e 36 h após a alimentação. Porém, 48 h após a alimentação o nível de transcritos era de 45% em relação aos controles e nenhum efeito do desenvolvimento das larvas foi observado. Quando as larvas foram alimentadas com dieta artificial contendo 35 µg/g de *HaTrf*-RNAdf nos dias 1, 3 e 5 foram observados efeitos de inibição do crescimento, redução do peso em relação ao controle e mortalidade de 36% após 5 dias (ZHANG et al., 2015). Visando demonstrar a natureza transiente do silenciamento via RNAi em *H. armigera*, Kumar et al. (2009) retiraram da dieta artificial o siRNA do gene *acetilcolinesterase* (*AChE* siRNA) após a alimentação das larvas com as moléculas de siRNA até o segundo ínstar e verificaram que as larvas atingiram crescimento normal, com peso de pupa comparável aos controles, e completaram o ciclo de vida. Já as larvas alimentadas continuamente com dieta artificial contendo *AChE* siRNA apresentaram 81% de inibição do crescimento (KUMAR et al., 2009).

Mesmo sendo verificado a natureza transiente do silenciamento do gene *rieske* em *H. armigera*, os resultados obtidos até o quinto dia de experimento, enquanto as larvas tinham alimentação contínua e exclusiva com disco foliares contendo o RNAdf-*rieske*, demonstraram o potencial do mecanismo de RNAi no silenciamento deste gene como estratégia de controle de *H. armigera* (CECCON, 2016). Desta forma, foram desenvolvidas construções para a expressão do hpRNA-*rieske* e transformação genética

de tabaco. O plasmídeo pMCG1005 utilizado é específico para a expressão de hpRNAs por possuir entre os sítios de muticlonagem, o íntron de arroz *Waxy-a*, separando as sequências senso e antissenso. Foi verificado que a utilização de sequências de íntrons funcionais como espaçadores para formação do hpRNA aumentou a eficiência de silenciamento em 50 a 100% quando utilizado para silenciamento de genes virais ou endógenos de planta, apresentando melhores resultados em relação à utilização de sequências espaçadoras não intrônicas (SMITH et al., 2000). O processo de excisão do íntron da construção pode ajudar a alinhar as fitas do *hairpin* favorecendo a hibridização do RNA e promovendo a formação de um duplex. Além disso, o *splicing* pode aumentar a quantidade de hpRNAs por facilitar ou retardar a passagem do *hairpin* do núcleo ou ainda criando um loop menor que seria menos sensível a nucleases (SMITH et al., 2000).

No presente trabalho, utilizando o gene *rieske*, os resultados demonstraram a alta eficiência das plantas transgênicas expressando o hpRNA-*rieske* em relação à aplicação tópica de moléculas de RNAdf-*rieske*. Enquanto a disponibilização de moléculas sintetizadas *in vitro* causou 13% de mortalidade aos 5 dias de experimentos, representando cerca de 10% de mortalidade acima do controle, as larvas alimentadas com o evento R12/2 apresentaram 100% de mortalidade aos seis dias de experimento, sendo de 40 e 30% acima do controle nas gerações R1 e R2 das plantas, respectivamente. Nos bioensaios com as plantas transgênicas contendo o gene para expressão do hpRNA-*rieske* foi verificado o início da mortalidade das larvas a partir do segundo dia de experimento.

Mamta et al. (2016) trabalhando com plantas de tabaco e tomate geneticamente transformadas expressando o hpRNA do gene da *chitinase* (*Ha-CHI*) verificaram que as larvas estavam aparentemente normais até o 2-3 dia e, posteriormente, começaram a apresentar crescimento mais lento em relação ao controle e maior mortalidade no quinto dia. Já Han et al. (2017) avaliando plantas transgênicas de algodão expressando o hpRNA do gene *receptor hormônio 3* (*HaHR3*) obtiveram 100% de mortalidade após 5 dias de alimentação de larvas de terceiro instar de *H. armigera* alimentadas com as plantas transgênicas. Zhang et al. (2015) também verificaram que os níveis de transcritos do gene *HaTrf* foram suprimidos gradualmente pela alimentação com RNAdf-*HaTrf*. Possivelmente isto ocorre devido ao tempo necessário para as moléculas indutoras do

silenciamento sejam absorvidas pelas células do intestino médio, processadas e medeiem a redução dos transcritos dos genes via RNAi (ZHANG et al., 2015).

Além da mortalidade observada nas larvas decorrente da alimentação com as plantas GM para expressão do hpRNA-*rieske* destaca-se a redução do nível de transcritos do gene *rieske* no sistema digestório e tecidos do restante do corpo. Enquanto a alimentação das larvas com moléculas de RNA d -*rieske* sintetizadas *in vitro* resultou em 30% de silenciamento (CECCON, 2016), as larvas alimentadas com os eventos transgênicos o silenciamento apresentaram até 85% no sistema digestório e 77% nos tecidos do restante do corpo (evento R38/1- R1, ver Figura 29).

A utilização do método de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* possibilitou a obtenção de diversos eventos de tabaco geneticamente modificado contendo os genes para a expressão do hpRNA-*rieske* e da proteína entomotóxica Jaburetox (JBTX) via *A. tumefaciens*. Este método de transformação genética tem sido amplamente utilizado por apresentar vantagens que envolvem a inserção de menor número de cópias do transgenes e em locais transcripcionalmente ativos do genoma (ISHIDA et al., 2007).

Porém, estudos de transformação genética de tabaco com construções para expressão de hpRNA/siRNA tem demonstrado a inserção de uma ou múltiplas cópias, fato que acaba interferindo na segregação e expressão dos transgenes (XIONG et al., 2013; MAMTA et al., 2016; SAINI et al., 2018). Além do número de cópias, diferentes locais de inserção pode afetar a expressão dos transgenes e conseqüentemente a eficiência do hpRNA/siRNA em causar a mortalidade e outros efeitos subletais no desenvolvimento dos insetos alvo (MAMTA et al., 2016).

Os resultados obtidos nos pré-bioensaios e nos bioensaios demonstram grande variação na resposta das larvas à alimentação com diferentes eventos ou até mesmo entre plantas irmãs do mesmo evento, sendo que mortalidade variou de 0 a 80% aos 8 dias de experimento nas plantas hpRNA-*rieske* da geração R1. Mamta et al. (2016) observaram que diferentes eventos *HaCHI*-hpRNA demonstraram variação de 6 a 30% de mortalidade

após 6 dias de experimento, e 13 a 53% após 8 dias. Os autores também verificaram variação na expressão do siRNA, muitas vezes coerentes com as diferenças encontradas na mortalidade.

A manipulação das larvas durante a realização dos bioensaios pode ter contribuído para a mortalidade verificada nas larvas alimentadas com as plantas controle negativo não submetidas ao processo de transformação genética, especialmente nas plantas da geração R1. A ocorrência de mortalidade mesmo após a transferência para a dieta e o aumento no número de ínstaes, já que a maioria das larvas passou por 7 ínstaes, podem ser indicativos que além da mortalidade causada pela manipulação, algumas características da planta de tabaco podem ter interferido na sobrevivência das larvas.

O tabaco apresenta em suas folhas, caules e flores inúmeros tricomas glandulares que produzem um material viscoso e pegajoso (LEON, 1987). A presença de tricomas constitui uma das principais barreiras mecânicas de resistência de plantas a insetos, especialmente nos primeiros estádios de desenvolvimento larval (VENDRAMIM; GUZZO, 2009). A qualidade nutricional da planta, de acordo com a demanda nutricional do inseto, e a presença de compostos secundários do metabolismo podem afetar a biologia e a sobrevivência dos insetos. Em *Nicotiana tabacum* já foram isolados diversos metabólitos secundários como os sesquiterpenos (FENG et al., 2010), diterpenos (SHINOZAKI et al., 1996), alcaloides (WEI et al., 2005), compostos fenólicos (VEREECKE et al., 1997), flavonoides (CHIEN et al., 2018) e lectinas (DELPORTE et al., 2015).

Apesar da composição química e características morfológicas das plantas de tabaco possuírem potencial de interferir na biologia de insetos-praga, esta planta é amplamente utilizada para estudos de transformação genética, como planta modelo, inclusive em estudos de expressão de hpRNA para controle de *H. armigera* (MAO et al., 2007; XIONG et al., 2013; AGRAWAL et al., 2015; MAMTA et al., 2016; SAINI et al., 2018) e para expressão do peptídeo Jaburetox (MULINARI, 2008). Além disso, as plantas são de fácil cultivo, disponibilizam grande área foliar para realização dos bioensaios,

permitem a fecundação cruzada para realização do empilhamento gênico, e produzem grande número de sementes.

A segunda estratégia utilizada neste trabalho foi o emprego de plantas transgênicas contendo o gene para a expressão do peptídeo entomotóxico JBTX para o controle de *H. armigera*. O peptídeo recombinante JBTX representa a porção terminal da urease de *Canavalia ensiformis* que é liberada após a ação da protease digestiva do inseto (MULINARI et al., 2007). O potencial entomotóxico deste peptídeo foi recentemente avaliado em larvas de *H. armigera* neonatas e terceiro ínstar por Didoné (2018). Às larvas neonatas foram disponibilizados 16 µg do peptídeo em 1 cm² de disco foliar de milho (0,5 cm² no dia 0 e 0,5 cm² no dia 2), a partir do quarto dia a alimentação foi realizada com discos foliares não contendo o peptídeo. Os resultados demonstraram 80% de mortalidade, menor consumo e atraso no desenvolvimento das larvas tratadas em relação ao controle em oito dias de experimento. Para as larvas de terceiro ínstar foram disponibilizados 80 µg do peptídeo em 5cm² de discos foliares de soja (1 cm²/dia do dia 0 ao dia 4) após o quinto dia a alimentação foi realizada utilizando discos foliares não tratados. Nas larvas de terceiro instar foi verificado 100% de mortalidade após nove dias de experimento. Porém, diferentemente do observado com as larvas neonatas não houve redução do peso e consumo em relação ao controle (DIDONÉ, 2018).

Nos bioensaios com os eventos simples e empilhados contendo o gene para expressão do JBTX é possível verificar que a maioria dos tratamentos não diferem do controle em relação a peso e consumo e em alguns casos são superiores ao controle nestas variáveis. Estes dados sugerem que a alimentação pode ser mantida no sistema digestório, não podendo ser absorvida e utilizada como fonte nutricional e, como resultado, os insetos são estimulados a continuar a se alimentar na tentativa de obter a nutrição necessária (DIDONÉ, 2018).

Um dos alvos de ação do JBTX são os túbulos de Malpighi, o JBTX age alterando os níveis de GMP cíclico e o potencial transmembrana dos túbulos de Malpighi interferindo na diurese dos insetos (STANISCUASKI et al., 2009). Os primeiros indícios do efeito antidiurético do JBTX foram verificados em *Rhodnius prolixus*. Foi detectado

que quando os insetos eram alimentados com canatoxina (CNTX), uma das isoformas da urease, o decréscimo do peso do inseto, que normalmente ocorre após a alimentação devido a excreção da urina, era reduzido, levando ao aumento do peso dos insetos em relação aos insetos não alimentados com a CNTX (CARLINI et al., 1997; STANISÇUASKI; CARLINI, 2012).

O mecanismo de ação do JBTX ainda não está totalmente elucidado e não há estudos de como atua em lepidópteros. Já foi verificado seu potencial de desestabilizar membranas biológicas (BARROS et al., 2009), possuir efeito antidiurético devido a ação nos túbulos de Malpighi (STANISÇUASKI et al., 2009), apresentar efeito neurotóxico devido a interferência na atividade das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) e UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase (UAP) (GALVANI et al., 2015) além de afetar a resposta imune, afetando a capacidade de neutralização de infecção bacteriana (FRUTTERO et al., 2016).

Galvani et al. (2015) estabeleceram que a UAP interagia fisicamente com o JBTX no SNC elevando a atividade enzimática da UAP. Entretanto, Fruttero et al. (2017) observaram que o JBTX desencadeia uma diminuição na expressão de RNAm de UAP e quitina sintetase, afetando a síntese de quitina. Em insetos a quitina tem um importante papel, uma vez que é componente da cutícula, glândulas salivares, traquéia, matriz peritrófica (MERZENDORFER, 2011). Assim, a ocorrência de más-formações durante a ecdise e presença de sulcos no tegumento das larvas podem ser decorrentes do efeito da proteína entomotóxica JBTX.

Foram realizados estudos de transformação genética de tabaco (MULINARI, 2008), cana de açúcar (BECKER-RITT et al., 2017), soja (dados não publicados) e milho (DIDONÉ, 2018) expressando a proteína entomotóxica JBTX visando avaliar seu potencial de controle de insetos-praga. Mulinari (2008) realizou a transformação genética de tabaco via *A. tumefaciens* para inserção do gene codificante para o peptídeo JBTX. As plantas obtidas foram ofertadas a *Spodoptera frugiperda* e induziram de 50 a 100% de mortalidade em 15 e 30 dias, a mortalidade foi relativa ao nível de expressão de JBTX em diferentes linhagens transgênicas. Becker-Ritt et al. (2017) produziram plantas de

cana-de-açúcar a partir de calos bombardeados. A avaliação das plantas quanto ao potencial entomotóxico aos lepidópteros *Diatraea saccharalis* e *Telchin licus licus*, demonstraram que as plantas são resistentes a estes insetos, causando até 100% de mortalidade das larvas.

Plantas de soja transformadas via *A. tumefaciens* e expressando o JBTX causaram 53% de mortalidade até o oitavo dia de experimento, enquanto as larvas estavam sendo alimentadas com as plantas GM, e 100% de mortalidade em 30 dias (dados não publicados). Plantas de milho GM obtidas via transformação com *A. tumefaciens* e expressando o gene da proteína entomotóxica JBTX foram testadas quanto aos efeitos causados em *S. frugiperda* quando as larvas foram submetidas à alimentação com as plantas transgênicas. O nível de mortalidade nas fases larval e de pupa foi de 39%, valor relativamente baixo quando comparado aos bioensaios utilizando o peptídeo purificado e plantas transgênicas avaliadas em *S. frugiperda* (MULINARI et al., 2007; MULINARI, 2008) e outros lepidópteros praga (BECKER-RITT et al., 2007; DIDONÉ, 2018). Porém foram observados efeitos subletais no desenvolvimento das larvas como o atraso no desenvolvimento, redução de peso, consumo e tamanho em relação as larvas alimentadas com as plantas controle e redução na fecundidade dos adultos (DIDONÉ, 2018).

No presente trabalho foi obtido cerca de 40% de mortalidade acima da verificada no controle, enquanto as larvas estavam sendo alimentadas com as plantas GM contendo o gene *JBTX* (10 dias de experimento). Já quando as larvas foram transferidas para dieta a mortalidade foi de 26% acima da verificada no controle. A ocorrência de mortalidade e persistência de efeitos deletérios mesmo após cessada a alimentação das larvas com as plantas foi relatada quando testadas plantas de soja (dados não publicados) e milho GM (DIDONÉ, 2018) quantos aos efeitos em *H. armigera* e *S. frugiperda*.

Os dados obtidos nos bioensaios demonstram o efeito entomotóxico de ambas as substâncias inseticidas utilizadas – hpRNA-*rieske* e JBTX – quando presentes em plantas GM de tabaco. Indicando o potencial de ambas tecnologias serem utilizadas como mecanismo de controle de *H. armigera* via produção de plantas transgênicas.

A utilização de plantas empilhadas para manejo de insetos apresenta vantagens em relação à utilização de plantas expressando somente uma substância inseticida, especialmente por retardar o aparecimento de insetos resistentes a ambos mecanismos presentes nas plantas empilhadas.

Os resultados obtidos no bioensaio com os eventos simples e empilhados demonstraram que os híbridos hpRNA-*rieske* x JBTX e JBTX x hpRNA-*rieske* não foram superiores ao parental R12/2, uma das possibilidades é que neste evento o gene esteja em homozigose resultando em maior nível de expressão do hpRNA-*rieske* em relação aos híbridos heterozigotos. No entanto a obtenção da homozigose nas plantas híbridas pode modificar esse cenário.

Ni et al. (2017) avaliaram o empilhamento de plantas expressando a toxina Bt e plantas expressando hpRNA complementares aos genes *JHAMT* (*JHA*) envolvido na síntese de hormônio juvenil, e *JHBP* (*JHB*), que transporta o hormônio juvenil para os órgãos, ambos complementares aos genes de *H. armigera*. A avaliação da progênie F2 dos híbridos em homozigose demonstrou que os híbridos Bt + RNAi foram superiores no controle de larvas de *H. armigera* suscetíveis a toxina Bt em relação ao evento homozigoto expressando somente o hpRNA-*JHA* e hpRNA-*JHB*. Porém as plantas empilhadas não diferiram do parental expressando somente a toxina Bt em larvas de *H. armigera* suscetíveis a esta toxina.

A utilização de plantas empilhadas para controle de insetos-praga retarda a evolução da resistência devido à baixa frequência inicial de indivíduos resistentes a ambas substâncias inseticidas (FERRÉ; VAN RIE, 2002). Porém, para que esta estratégia seja eficiente é necessário que as substâncias inseticidas possuam diferentes mecanismos de ação e não ocorra resistência cruzada (BERNARDI et al., 2011).

As tecnologias testadas neste trabalho são contrastantes em muitos aspectos. Enquanto o JBTX é um peptídeo derivado de urease vegetal, que possui efeito entomotóxico devido a ação da toxina em diversas atividades biológicas, o mecanismo de RNAi é baseado na expressão de moléculas de RNAdf com capacidade de suprimir o

nível de transcritos de genes endógenos específicos, dependendo da presença e ação da maquinaria RNAi na célula. Além disso, o JBTX é uma toxina de amplo espectro afetando insetos de diferentes ordens (MULINARI et al., 2007) e que apresenta efeito residual com ação na biologia do inseto mesmo após cessada a alimentação com o peptídeo (DIDONÉ, 2018). Já o RNAi é um mecanismo de silenciamento de genes específicos que apresentam complementariedade de pares de base com o RNA de fita dupla disponibilizado, porém depende de disponibilização contínua das moléculas desencadeadoras do silenciamento para verificação da redução do nível de transcritos e efeitos letais e subletais, especialmente em insetos da ordem Lepidoptera.

A grande vantagem da utilização dos híbridos hpRNA-*rieske* x JBTX e JBTX x hpRNA-*rieske* é o emprego de duas tecnologias de controle de insetos-praga com diferentes mecanismos de ação no inseto-praga alvo, fator que pode determinar maior durabilidade de ambas tecnologias. Além disso, se os híbridos foram levados à homozigose, mediante autofecundação, eles podem vir a superar os eventos parentais simples.

A avaliação do nível de expressão gênica nas larvas tratadas com o evento R12/2 e os híbridos demonstraram que alguns dos híbridos não apresentaram redução na expressão do gene *rieske* no sistema digestório e nos tecidos do restante do corpo das larvas, enquanto as larvas alimentadas com o evento R12/2 apresentaram redução no nível de transcritos de 62% no sistema digestório e 57% nos tecidos do restante do corpo.

O mecanismo de RNAi em lepidópteros é muito sensível e sujeito a diversos fatores que contribuem para a pobre resposta de silenciamento nestes insetos. A ausência do silenciamento nas larvas alimentadas com algumas plantas empilhadas pode ter ocorrido devido a interação entre as duas substâncias inseticidas e interferência do JBTX na efetiva captação do hpRNA pelas células ou até mesmo na resposta da maquinaria do mecanismo de RNAi, situação que deve ser melhor investigada.

6 CONCLUSÃO

Foi possível a obtenção de plantas geneticamente modificadas de tabaco contendo os genes para expressão do hpRNA-*rieske* e JBTX e ambas substâncias inseticidas, quando expressas nas plantas, causaram mortalidade e reduziram o consumo das larvas de *H. armigera*.

O cruzamento dos eventos simples hpRNA-*rieske* e JBTX resultou em progênies contendo ambos os genes de interesse. O empilhamento se mostrou viável e as larvas de *H. armigera* alimentadas com as plantas empilhadas apresentaram mortalidade e redução do consumo. Porém, novos estudos sobre a interação entre o mecanismo RNAi e JBTX e a indução da homozigose dos dois transgenes inseridos nas plantas irão fornecer melhores resultados em relação ao real potencial de controle e a viabilidade da utilização de ambas substâncias inseticidas em conjunto.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização de estudos moleculares na planta, especialmente relacionados ao número de cópias e expressão dos transgenes são importantes para melhor análise e compreensão dos resultados observados.

A análise dos híbridos hpRNA-*rieske* + JBTX e dos eventos simples, utilizados como parentais, que apresentam ambos os genes em homozigose pode fornecer melhores resultados quanto ao real potencial de controle de *H. armigera* utilizando ambas tecnologias empilhadas em plantas transgênicas. Além disso, os híbridos obtidos pelo cruzamento de outros parentais com bons resultados, como o evento R32/2, que causou alta mortalidade e baixo consumo, podem ser avaliados futuramente para melhor compreensão do empilhamento gênico das duas metodologias.

Posteriormente, verificado o potencial de utilização do empilhamento para controle de *H. armigera*, ambas tecnologias podem ser transferidas para plantas com maior interesse agrônômico que são atacadas por *H. armigera*, como algodão, soja, milho, citrus e tomate. Inclusive, plantas transgênicas de milho expressando o gene *JBTX* produzidas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e avaliadas quanto ao potencial de controle de *S. frugiperda* podem ser utilizadas para a introdução da construção gênica para expressão do hpRNA-*rieske* visando o empilhamento gênico e desenvolvimento de plantas resistentes a *H. armigera* e/ou outros lepidópteros intimamente relacionados como *Helicoverpa zea*, inseto-praga de milho.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, A.; RAJAMANI, V.; REDDY, V. S.; MUKHERJEE, S. K.; HATNAGAR, R. K. Transgenic plants over-expressing insect-specific microRNA acquire insecticidal activity against *Helicoverpa armigera*: an alternative to Bt-toxin technology. **Transgenic research**, v. 24, n. 5, p. 791-801, 2015.

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.

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

ARTHROPOD PESTICIDE RESISTNACE DATABASE. *Helicoverpa armigera*. Disponível em: <<https://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species&arId=41>>. Acesso em: 2 de fev. 2019.

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 δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Spain. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 90, n. 1, p. 51-54, 2005.

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.

BARROS, P. R.; STASSEN, H.; FREITAS, M. S.; CARLINI, C. R.; NASCIMENTO, M. A C.; FOLLMER, C. Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, n. 12, p. 1848-1854, 2009.

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.

BECHER-RITT, A. B.; PORTUGAL, C. S.; CARLINI, C. R. Jaburetox: update on a urease-derived peptide. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, p. 1-8, 2017.

BERNARDI, O.; ALBERNAZ, K. C.; VALICENTE, F. H.; OMOTO, C. Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas. In: BORÉM, A.; ALMEIDA, G. D. de. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Visconde de Rio Branco: Suprema, 2011. p. 179-204.

BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; MIKAMI, A.Y.; POMARI-FERNANDES, A.; BORTOLOTTI, O. C. Mais temidas. **Caderno Técnico Cultivar Grandes Culturas**, v. 1, n. 11, 2014.

BUENO; A. F.; SOSA-GOMÉZ, D. R. The old world bollworm in the Neotropical region: the experience of Brazilian growers with *Helicoverpa armigera*. **Outlooks on Pest Management**, v. 25, n. 4, p. 1-4, 2014.

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

CARLINI, C. R.; GOMES, C.; GUIMARAES, J. A.; MARKUS, R. P.; SATO, H.; TROLIN, G. Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin. **Acta pharmacologica et toxicologica**, v. 54, n. 3, p. 161-166, 1984.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, v. 19, n. 5, p. 667-675, 1981.

CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. **Toxicon**, v. 110, p. 90-109, 2016.

CARLINI, C. R.; POLACCO, J. C. Toxic properties of urease. **Crop Science**, v. 48, p. 1665-1672, 2008.

CARRIÈRE, Y.; CRICKMORE, N.; TABASHNIK, B. E. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 161, 2015.

CECCON, C. C. **RNA de interferência como alternativa para o controle de *Helicoverpa armigera***. 2016. 150 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Produção e Proteção de Plantas) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

CHIEN, S. K.; CHEN, L. C.; HUANG, H. C.; CHEN, L. C.; HSIAO, J. W.; CHENG, M. J.; CHEN, J. J. A New Flavone and Cytotoxic Constituents of *Nicotiana tabacum*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 54, n. 6, p. 1044-1047, 2018.

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.

CROWDER, D. W.; CARRIÈRE, Y. Comparing the refuge strategy for managing the evolution of insect resistance under different reproductive strategies. **Journal of Theoretical Biology**, v. 261, n. 3, p. 423-430, 2009.

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.

DEFFERRARI, M. S.; DEMARTINI, D. R.; MARCELINO, T. B.; PINTO, P. M.; CARLINI, C. R. Insecticidal effect of *Canavalia ensiformis* major urease on nymphs of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* and characterization of digestive peptidases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 6, p. 388–399, 2011.

DELPORTE, A.; VAN HOLLE, S.; LANNOO, N.; JM VAN DAMME, E. The tobacco lectin, prototype of the family of Nictaba-related proteins. **Current Protein and Peptide Science**, v. 16, n. 1, p. 5-16, 2015.

DIDONÉ, D. A. **Desenvolvimento de plantas de milho que expressam Jaburetox visando resistência a lepidópteros-praga**. 2018. 100 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

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

DIXON, N. E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, n. 14, p. 4131–4133, 1975.

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.

DURIGAN, M. R.; CORRÊA, A. S.; PEREIRA, R. M.; LEITE, N. A.; AMADO, D.; DE SOUSA, D. R.; OMOTO, C. High frequency of CYP337B3 gene associated with control failures of *Helicoverpa armigera* with pyrethroid insecticides in Brazil. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 73-80, 2017

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

FENG, X.; WANG, J. S.; LUO, J.; KONG, L. Y. A pair of sesquiterpene glucosides from the leaves of *Nicotiana tabacum*. **Journal of Asian natural products research**, v. 12, n. 3, p. 252-256, 2010.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 47, n. 1, p. 501-533, 2002.

FERREIRA DA SILVA, C. T.; GOMBAROVITS, M. E.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, C. M.; CARLINI, C. R. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 44, p. 162-171, 2000.

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.

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.

FOLLMER, C.; PEREIRA, F. V.; DA SILVEIRA, N. P.; CARLINI, C. R. Jack bean urease (EC 3.5.1.5) aggregation monitored by dynamic and static light scattering. **Biophysical Chemistry**, v. 111, p. 79-87, 2008.

FRANÇOIS, I. E. J. A.; BROEKAERT, W. F.; CAMMUE, B. P. A. Different approaches for multi-transgene-stacking in plants. **Plant Science**, v. 163, n. 2, p. 281-295, 2002.

FRUTTERO, L. L.; MOYETTA, N. R.; UBERTI, A. F.; GRAHL, M. V.; LOPES, F. C.; BROLL, V.; FEDER, D.; CARLINI, C. R. Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 412. 2016.

GALVANI, G. L.; FRUTTERO, L. L.; CORONEL, M. F.; NOWICKI, S., DEMARTINI, D. R.; DEFFERRARI, M. S.; POSTAL, M.; CANAVOSO, L. E.; CARLINI, C. R.; SETTEMBRINI, B. P. Effect the urease-derived peptide Jaburetox on the central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta: Heteroptera). **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1850, p. 255-262, 2015.

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 double stranded 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.

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, 2011.

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.

HAN, Q.; WANG, Z.; HE, Y.; XIONG, Y.; LV, S.; LI, S.; ZHANG, Z.; QIU, D.; ZENG, H. Transgenic cotton plants expressing the HaHR3 gene conferred enhanced resistance to *Helicoverpa armigera* and improved cotton yield. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 9, p. 1874.

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.

ISAAA. **Stacked Traits in Biotech Crops**. ISAAA Pocket K No. 42: 2017. ISAAA: Ithaca, NY.

ISAAA 2019a. **Event MON87411**. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/event/default.asp?EventID=367>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2019.

ISAAA 2019b. **GM Approval Database**. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/default.asp>>. Acesso em: 15 de fev. de 2019.

ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium* mediated transformation of maize. **Nature Protocols**, v. 2, n. 7, p. 1614-1621, 2007.

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.

KAPPAUN, K. **Estudos com o Jaburetox: efeito tóxico de E. coli liofilizadas carregadas com o peptídeo e análise da influência do epítipo v5 na formação de agregados**. 2011. 50 f. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

KATOCH, R.; THAKUR, N. Advances in RNA interference technology and its impact on nutritional improvement, disease and insect control in plants. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 169, n. 5, p. 1579-1605, 2013.

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: 15 fev. 2019.

LEON, J. **Botánica de los cultivos tropicales**. San José: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 1987. 445 p.

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.

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.

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.

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.

_____. RAJAM, M. V. RNAi technology: a new platform for crop pest control. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 3, p. 487-501, 2017.

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.

MAO, J.; ZENG, F. Plant-mediated RNAi of a gap gene-enhanced tobacco tolerance against the *Myzus persicae*. **Transgenic research**, v. 23, n. 1, p. 145-152, 2014.

MARTINELLI, A. H. S.; KAPPAUN, K.; LIGABUE-BRAUN, R.; DEFFERRARI, M. S.; PIOVESAN, A. R.; STANISÇUASKI, F.; DEMARTINI, D. R.; DAL BELO, C. A.; ALMEIDA, C. G. M.; FOLLMER, C.; VERLI, H.; CARLINI, C. R.; PASQUALI, G. Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 3, p. 935–944, 2014.

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. Suppression 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.

MERZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 9, p. 759– 769. 2011.

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.

MULINARI F. **Ureasas de *Canavalia ensiformis* e peptídeo inseticida derivado**. 2008. 163 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

_____. STANISÇUASKI, F.; BERTHOLDO-VARGAS, L. R.; POSTAL, M.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; RIGDEN, D. J.; CARLINI, C. R. Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, v. 28, n. 10, p. 2042–50, 2007.

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.

NANDETY, R. S.; KUO, Y. W.; NOURI, S.; FALK, B. W. Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. **Bioengineered**, v. 6, n. 1, p. 8-19, 2015.

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.

NI, M.; MA, W.; WANG, X.; GAO, M.; DAI, Y.; WEI, X.; ZHANG, L.; PENG, Y.; CHEN, S.; DING, L.; TIAN, Y.; LI, J.; WANG, H.; WANG, X.; XU, G.; GUO, W.; YANG, Y.; WU, Y.; HEUBERGER, S.; TABASHNIK, B. E.; ZHANG, T.; ZHU, Z. Next-generation transgenic cotton: pyramiding RNAi and Bt counters insect resistance. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 9, p. 1204-1213, 2017.

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: 5 de fev. 2019.

PIRES-ALVES, M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; BARCELLOS, G. B. S.; CARLINI, C. R.; MORAES, M. G. Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, n. 2, p. 139–145, 2003.

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, p. e25709, 2011.

POLACCO, J. C.; HOLLAND, M. A. Roles of urease in plant cells. In: International review of cytology. **Academic Press**, 1993. p. 65-103.

POMARI-FERNANDES, A.; DE FREITAS BUENO, A.; SOSA-GÓMEZ, D. R. *Helicoverpa armigera*: current status and future perspectives in Brazil. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 21, n. 1, 2015.

QUE, Q.; CHILTON, M. D. M.; DE FONTES, C. M.; HE, C.; NUCCIO, M.; ZHU, T.; WU, Y.; CHEN, J. S.; SHI, L. Trait stacking in transgenic crops: challenges and opportunities. **GM Crops**, v. 1, n. 4, p. 220-229, 2010.

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.

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.

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

SAINI, R. P.; RAMAN, V.; DHANDAPANI, G.; MALHOTRA, E. V.; SREEVATHSA, R.; KUMAR, P. A.; SHARMA, T. R.; PATTANAYAK, D. Silencing of HaAcel gene by host-delivered artificial microRNA disrupts growth and development of *Helicoverpa armigera*. **PloS one**, v. 13, n. 3, p. e0194150, 2018.

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.

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.

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.

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 fev. 2019.

SHAKESBY, A. J.; WALLACE, I. S.; ISAACS, H. V.; PRITCHARD, J.; ROBERTS, D. M.; DOUGLAS, A. E. A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 1-10, 2009.

SHINOZAKI, Y.; TOBITA, T.; MIZUTANI, M.; MATSUZAKI, T. Isolation and identification of two new diterpene glycosides from *Nicotiana tabacum*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 60, n. 5, p. 903-905, 1996.

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.

SLANSKY, F.; RODRIGUEZ, J. G. Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates: an overview. In: **Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates**. New York: Wiley, 1987. P. 1-69.

SMITH, N. A.; SINGH, S. P.; WANG, M. B.; STOUTJESDIJK, P.; GREEN, A.; WATERHOUSE, P.M. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 319-320, 2000.

STANISÇUASKI, F.; FERREIRA-DASILVA, C. T.; MULINARI, F.; PIRES-ALVES, M.; CARLINI, C. R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Toxicon**, v. 45, p. 753–760, 2005.

_____. BRUGGE, V.; CARLINI, C. R.; ORCHARD, I. In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 255–263, 2009.

_____. CARLINI, C. R. Plant ureases and related peptides: Understanding their entomotoxic properties. **Toxins**, v. 4, p. 55–67, 2012.

SUMNER, J. B. The isolation and crystalization of the enzyme urease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 69, p. 435-441, 1926.

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.

TAY, W. T.; SORIA, M. F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G. T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80134, 2013.

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.

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

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

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

VENDRAMIM, J. D.; GUZZO, E. C. Resistência de plantas e a bioecologia e nutrição dos insetos. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Ed.). **Bioecologia e nutrição dos insetos: base para o manejo integrado de pragas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Londrina: Embrapa Soja, 2009. p.1055-1105.

WANG, J. H.; TARR, D. A. On the mechanism of urease action. **Journal of the American Chemical Society**, v. 77, n. 23, p. 6205-6206, 1955.

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.

WEI, X., SUMITHRAN, S. P.; DEACIUC, A. G.; BURTON, H. R.; BUSH, L. P.; DWOSKIN, L. P.; CROOKS, P. A. Identification and synthesis of novel alkaloids from the root system of *Nicotiana tabacum*: affinity for neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 495-505, 2005.

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

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.

XIONG, Y.; ZENG, H.; ZHANG, Y.; XU, D.; QIU, D. Silencing the HaHR3 gene by transgenic plant-mediated RNAi to disrupt *Helicoverpa armigera* development. **International journal of biological sciences**, v. 9, n. 4, p. 370, 2013.

XU, J.; WANG, X. F.; CHEN, P.; LIU, F. T.; ZHENG, S. C.; YE, H.; MO, M. H. RNA interference in moths: mechanisms, applications, and progress. **Genes**, v. 7, n. 10, p. 88, 2016.

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.

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.

ZARA, A. L. D. S. A.; SANTOS, S. M. D.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.

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, p. 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, 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.

ZHAO, J. Z.; CAO, J.; COLLINS, H. L.; BATES, S. L.; ROUSH, R. T.; EARLE, E. D.; SHELTON, A. M. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 24, p. 8426-8430, 2005.

ANEXOS

Anexo I Protocolo de transformação genética de tabaco utilizando *A. tumefaciens*
(*Horticultural Research Laboratory – USDA-ARS*)

1. Crescer *A. tumefaciens* a 28°C em meio YEP com o antibiótico apropriado, no caso da EHA 101 contendo o plasmídeo pMCG1005 os antibióticos a serem utilizados são canamicina e spectinomicina.
2. Precipitar as bactérias e resuspender o *pellet* em meio de infecção (OD₆₀₀= 0,6 a 1).
3. Preparar os explantes: cortar discos foliares de tabaco de 0,5 a 1 cm².
4. Incubar os explantes com a solução de *A. tumefaciens* por 3 a 5 min.
5. Colocar os explantes sobre folhas de papel absorvente estéreis para retirar o excesso de bactéria dos explantes.
6. Colocar os explantes em meio de cocultivo e manter em câmara de crescimento a 27°C durante 3 dias.
7. No terceiro dia, colocar os explantes sobre folhas de papel absorvente estéreis e transferir para meio de seleção. Usar 5 explantes por placa
8. Manter as placas em câmara de crescimento a 28°C com fotoperíodo de 16 horas de luz.
9. Após 3 a 5 semanas brotações crescerão das bordas dos explantes. Quando as brotações estiverem do tamanho suficiente para serem separadas dos explantes, cortar as brotações e transferir para meio de enraizamento.
10. Após a formação de raízes, aclimatizar as plantas e transferir para a casa de vegetação.

Anexo II Meios de cultura utilizados no processo de transformação genética
(Horticultural Research Laboratory – USDA-ARS)

Meios	Composição
YEP sólido	5 g/L extrato de levedura, 10 g/L peptona, 5 g/L NaCl, 8 g/L de ágar, pH 6.8.*
YEP líquido	5 g/L extrato de levedura, 10 g/L peptona, 5 g/L NaCl, 8 g/L de ágar, pH 6.8.*
Infecção	Sais MS com vitaminas, 0,1mg/L de ANA (ácido naftalenoacético), 1 mg/L de BAP (6-benzilaminopurina), 3% de sacarose.*
Co-cultivo	Sais MS com vitaminas, 0,1mg/L de ANA, 1 mg/L de BAP, 3% de sacarose, 8g/L de ágar.*
Seleção	Sais MS com vitaminas, 0,1mg/L de ANA, 1 mg/L de BAP, 3% de sacarose, 8g/L de ágar, 500 mg/L de cefatoxima e 3,0 mg/L de Bialaphos®.*
Enraizamento	Sais MS com vitaminas, 0,1mg/L de ANA, 3% de sacarose, 8g/L de ágar, 500 mg/L de cefatoxima e 3,0 mg/L de Bialaphos®.*

* Os antibióticos, fitoreguladores e agente seletivo, quando necessários, serão adicionados após a autoclavagem dos meios com temperaturas em torno de 50°C.



PPGAgro

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV