



**UnB**

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Pós-Graduação em Biologia Molecular

Validação de moléculas de dsRNA visando o controle da broca-gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*, Drury 1770) e da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*, Fabricius 1794)

Daniel David Noriega Vásquez

Brasília

2018

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Pós-Graduação em Biologia Molecular

Validação de moléculas de dsRNA visando o controle da broca-gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*, Drury 1770) e da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*, Fabricius 1794)

Daniel David Noriega Vásquez

Orientadora: Dra. Maria Fátima Grossi de Sá

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de mestre em Biologia Molecular.

Brasília

2018

## **Banca Examinadora**

**Dr. Bergmann Morais Ribeiro (membro interno)**

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília

**Dr. Erich Yukio Tempel Nakasu (membro externo)**

Embrapa Hortaliças

**Dr<sup>a</sup>. Maria Fátima Grossi de Sá (Orientadora)**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Dr. Elibio Leopoldo Rech Filho (suplente)**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Brasília

2018

Dedico este trabalho para louvor de Deus, meu criador, protetor e o responsável de guiar meu caminho. Assim, como a minha família, que tem todo o merito pela minha formação pessoal e profissional.

## **Agradecimentos**

Agradeço em primeiro lugar a Yahweh, meu Deus, criador, senhor, pai, protetor, mentor, refugio, provedor, libertador, guerreiro e amigo. A ele devo tudo o que sou e o que tenho conseguido, quem me deu todos meus talentos, formou meu caráter e me ajuda a superar minhas fraquezas cada dia.

Agradeço a minha família por ser a maior motivação da minha vida. A minha mãe Floripes por me ensinar os caminhos da cautela, a calma e a sabedoria. A meu pai Yorlli por ter me ensinado a nunca desistir, a enfrentar meus medos e a fazer tudo com paixão. A meu irmãozinho Efraín por acreditar sempre em mim e nos meus sonhos.

Um agradecimento especial ao meu melhor amigo David Augusto Orduy, o irmão que escolhi, quem me ajudou a controlar meus demônios nos momentos difíceis deste processo, me ensinando a rir da vida e de mim mesmo.

Outro grande agradecimento a um amigo extraordinário que conheci durante este processo, Joaquin Felipe Roca, por ter sido o irmão mais velho que nunca tive, por me ensinar a amadurecer pessoal e profissionalmente e finalmente por me aguentar de forma tão corajosa estes dois anos.

Aos integrantes do grupo de bioinformática do laboratório de interação molecular planta praga I: à Dra. Saluana Rocha por ser a luz que iluminava os dias cinzas com sua admirável energia, dedicação e paixão. Ao Dr. Muhammed Faheem por me orientar com a parte bioquímica do meu trabalho e finalmente ao meu colega Fabricio Arraes por ter trabalhado incessantemente comigo em todas as análises bioinformáticas e me orientar sempre com a melhor das atitudes.

Aos demais integrantes do laboratório de interação molecular planta praga I, que me ajudaram em diferentes momentos deste processo. Especialmente a Thuanne Ribeiro, Leonardo Pepino, Hudson Moura, Clidia Moreira, Daniela Amaral, Niday Nunes, Naldo Silva, François Xavier, Caroline Bournaud, Reneida Mendes e Dijair Souza.

À equipe de bioinformática do Cenargen, o Dr. Roberto Togawa e a Dra. Priscila Grynberg pelas orientações nas análises de processamento de sequencias.

Às pessoas que cuidadosamente corrigiram minha dissertação: a Dra. Saluana Rocha, a Dra. Cristina Mattar, o Dr. Alexandre Firmino e o meu colega Fabricio Arraes.

À Dra. Fátima Grossi, a incansável líder do laboratório de interação molecular planta praga, pela grande oportunidade e orientação, que me ajudaram a crescer profissionalmente e pessoalmente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo fornecimento de toda a estrutura e pelos recursos disponibilizados.

À Universidade de Brasília, pelo enriquecimento acadêmico e cultural que obtive desta maravilhosa instituição.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular por ter me permitido viver esta aventura de fazer um curso de pos-graduação fora do meu país natal.

## Sumário

<b>Lista de Figuras</b> .....	4
<b>Lista de Tabelas</b> .....	9
<b>Abreviaturas</b> .....	10
<b>Resumo</b> .....	13
<b>Abstract</b> .....	14
<b>1. Introdução Geral</b> .....	15
1.1 Cultura da cana-de-açúcar.....	15
1.2 Cultura canavieira no Brasil.....	16
1.3 Controle de pragas na cultura da cana-de-açúcar .....	17
1.4 Broca da cana-de-açúcar .....	19
1.5 Broca-gigante da cana-de-açúcar.....	22
1.6 RNA de interferência como alternativa de controle .....	26
<b>2. Justificativa</b> .....	27
<b>3. Objetivo Geral</b> .....	28
3.1 Objetivo capítulo I .....	28
3.2 Objetivo capítulo II.....	28
<b>Capítulo I - Sequenciamento dos transcritomas de <i>D. saccharalis</i> e <i>T. l. licus</i>, e análise da expressão gênica em diferentes dietas.</b> .....	29
<b>1. Introdução</b> .....	30
1.1 Sequenciamento de ácidos nucleicos .....	30
1.2 Sequenciamento de segunda geração.....	31
1.3 Sequenciamento de RNA .....	31
1.4 Transcritômica em insetos .....	33
1.5 Análise de expressão diferencial de genes.....	34
1.6 Estudo da expressão genica em insetos .....	36
<b>2. Objetivo geral</b> .....	38
2.1 Objetivos específicos .....	38
<b>3. Material e métodos</b> .....	39
3.1 Obtenção dos insetos e extração de RNA .....	39
3.2 Análise dos transcritomas .....	40
3.2.1 Pré-processamento das sequências.....	40

3.2.2 Montagem e anotação.....	40
3.2.3 Análise de expressão diferencial .....	41
3.2.4 Enriquecimento de termos GO .....	41
<b>4. Resultados e discussão .....</b>	<b>42</b>
4.1 Extração de RNA total .....	42
4.2 Análise dos transcritomas .....	42
4.2.1 Pré-processamento .....	42
4.2.2 Montagem <i>de novo</i> e anotação funcional .....	43
4.2.3 Expressão diferencial de genes .....	48
4.2.4 Análise de enriquecimento por ontologia gênica .....	50
<b>5. Conclusões e Perspectivas .....</b>	<b>62</b>
<b>Capítulo II - Validação de moléculas de dsRNA com potencial para o controle de <i>D. saccharalis</i> e <i>T. l. licus</i> via administração oral.....</b>	<b>63</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>64</b>
1.1 RNA interferente.....	64
1.2 Mecanismo do RNAi .....	64
1.3 Métodos de entrega do dsRNA .....	67
1.4 RNAi para o controle de insetos-pragas de impacto no setor agrícola .....	68
1.5 RNAi em Lepidoptera.....	70
1.6 Seleção de genes alvo para silenciamento por RNAi .....	71
1.7 Hormônio juvenil e sua importância no desenvolvimento dos insetos.....	72
1.8 Enzimas da via de degradação do hormônio juvenil .....	74
1.8.1 Esterase do hormônio juvenil.....	74
<b>2. Objetivo geral.....</b>	<b>75</b>
2.1 Objetivos específicos .....	75
<b>3. Material e Métodos .....</b>	<b>76</b>
3.1 Insetos .....	76
3.2 Identificação do gene da JHE nos transcritomas de <i>D. saccharalis</i> e <i>T. l. licus</i> .....	76
3.3 Extração de RNA e síntese de cDNA .....	77
3.4 Desenho, síntese e teste de <i>primers</i> .....	77
3.5 RT-PCR quantitativa (qRT-PCR).....	79
3.6 Determinação do perfil de expressão do gene <i>jhe</i> .....	80
3.7 Desenho e síntese do molde para dsRNA .....	80
3.8 Expressão <i>in vitro</i> das moléculas de dsRNA .....	81

3.9 Bioensaios com <i>D. saccharalis</i> e <i>T. licus licus</i> .....	81
3.9.1 Avaliação da quantidade de dsRNA ótima .....	82
3.9.2 Avaliação do tempo ótimo para o efeito de silenciamento .....	83
3.9.3 Avaliação da resposta localizada de silenciamento no intestino.....	83
3.9.4 Avaliação do efeito fenotípico produzido pelo silenciamento do gene <i>jhe</i> .....	83
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	84
4.1 Identificação dos genes <i>jhe</i> nos transcritomas de <i>D. saccharalis</i> e <i>T. l. licus</i> .....	84
4.2 Extração de RNA .....	87
4.3 Análise de estabilidade para os genes de referência em <i>D. saccharalis</i> .....	88
4.4 Determinação do perfil de expressão do gene <i>jhe</i> .....	88
4.5 Síntese <i>in vitro</i> das moléculas de dsRNA .....	92
4.6 Bioensaios em <i>D. saccharalis</i> e <i>T. licus licus</i> .....	93
4.6.1 Determinação da quantidade ótima de dsRNA .....	93
4.6.2 Determinação do tempo de persistência do efeito de RNAi .....	96
4.6.3 Determinação da resposta localizada de silenciamento .....	97
4.6.4 Avaliação do efeito fenotípico associado ao silenciamento do gene <i>jhe</i> .....	99
<b>5. Conclusões e Perspectivas</b> .....	108
<b>Referencias Bibliograficas</b> .....	109
<b>Anexos</b> .....	131

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Principais fases de desenvolvimento da broca da cana-de-açúcar (*D. saccharalis*). A) Ovos (Postura). B) Larva de quinto ínstar. C) Pupa em fase avançada. D) Adulto. Adaptado de Cruz (2007). ..... 20
- Figura 2.** Parasitoides da broca da cana (*D. saccharalis*). A) *Cotesia flavipes* parasitando lagarte de quinto ínstar. B) *Trichogramma galloi* parasitando massa de ovos. Adaptado de Nava *et al.* (2009). ..... 21
- Figura 3.** Principais fases de desenvolvimento da broca-gigante da cana-de-açúcar (*T. l. licus*). A) Ovos. B) Larva de quinto ínstar. C) Pupa em fase avançada. D) Adulto. Adaptada de Negrisoli *et al.* (2015). ..... 23
- Figura 4.** Colmo da cana-de-açúcar brocado por lagartas de quinto ínstar de broca-gigante. A coloração rosa é indiativo para o sintoma da podridão vermelha. .... 25
- Figura 5.** Esquema de um típico experimento de RNA-seq. Longas moléculas de RNAs são fragmentadas primeiro a uma biblioteca de sequencias curtas de cDNA, por meio de fragmentação do RNA ou do cDNA. Adaptadores de sequenciamento (Azul), são subsequentemente adicionados a cada fragmento de cDNA, obtendo sequências curtas para cada cDNA. Os *reads* resultantes são alinhados com um genoma ou transcrito de referência, e classificados em três tipos: reads exônicos, reads de ligação e reads com cauda poli-A. Esses três tipos de reads são usados para gerar um perfil de expressão para cada gene, como representado na parte inferior; uma fase de leitura aberta (ORF: *Open Reading frame*), de uma levedura é mostrado na ilustração. Adaptado de Wang *et al.* (2009). ..... 32
- Figura 6.** RNA total extraído de *T. l. licus* e *D. saccharalis*, visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%. As condições de alimentação correspondem a: 1) Cana-de-açúcar replica I, 2) Cana-de-açúcar replica II, 3) Dieta artificial replica I, 4) Dieta artificial replica II, 5) Jejum replica I, 6) Jejum replica II, 7) Cana-de-açúcar replica I, 8) Cana-de-açúcar replica II, 9) Dieta artificial replica I, 10) Dieta artificial replica II, 11) Jejum replica I, 12) Jejum replica II. A) Biblioteca de referência de *T. l. licus*, B) Biblioteca de referência de *D. saccharalis*. O marcador de DNA utilizado foi o 1Kb plus Ladder (Invitrogen). ..... 42
- Figura 7.** Resultados da busca por homologia (Blast), mostrando as espécies com maior número de hits correspondentes às sequências obtidas a partir dos transcritos de: A) *D. saccharalis* e B) *T. l. licus*. ..... 45
- Figura 8.** Resultados da busca por homologia (Blast), mostrando o número de hits correspondente a gêneros de microrganismos previamente reportados como parte da microbiota de outros lepidópteros. A) *D. saccharalis*. B) *T. l. licus*. ..... 46
- Figura 9.** Resultados da anotação funcional de genes por ontologia gênica (GO), mostrando o número de sequências anotadas com os termos de nível II pertencentes às três categorias principais de GO: A) Processos biológicos B) Componente celular e C) Função molecular. As barras pretas correspondem a *D. saccharalis* e as barras brancas a *T. l. licus*. ..... 47
- Figura 10.** Mapas de calor mostrando os níveis de expressão normalizados dos DEGs obtidos a partir da análise de expressão diferencial dos transcritos de intestino de: A) *D. saccharalis* B) *T. l. licus*. A escala mostrando os valores de Log<sub>2</sub>(FPKM), representa os níveis de expressão desde o menor (-4) até o maior (4). DaI: Dieta artificial replica I. DaII: Dieta artificial replica II. CaI: Cana-de-açúcar replica I. CaII: Cana-de-açúcar replica II. .... 49
- Figura 11.** Termos GO mais enriquecidos para cada conjunto de genes diferencialmente expressos nos transcritos de *D. saccharalis* e *T. l. licus*. Estão representados os termos não redundantes, com maior frequência de enriquecimento observada nos conjuntos de DEGs

obtidos a partir da análise do FUNC. 1) *D. saccharalis*. 2) *T. l. licus*. A figura mostra de forma independente, os termos das três categorias principais de ontologia gênica: A) Processos biológicos, B) Função molecular e C) Componente celular. As barras pretas representam o conjunto de genes super-expressos na condição de alimentação com cana-de-açúcar e as barras brancas o conjunto de genes super-expressos na condição de alimentação com dieta artificial..... 51

**Figura 12.** Mapas de calor mostrando a expressão dos genes anotados com os termos mais enriquecidos, compartilhados no conjunto de DEGs dos dois transcritomas. Na figura pode visualizar-se a expressão normalizada dos DEGs relacionados com transporte de moléculas (caixas verdes) e degradação de proteínas (caixas amarelas). A) *D. saccharalis* e B) *T. l. licus*. A abreviação UNI representa *contigs* únicos para cada gene. Ca: Insetos alimentados com cana-de-açúcar. Da: Insetos alimentados com dieta artificial. A escala de expressão, representada do lado direito de cada *Heatmap*, está determinada pelos valores de  $\text{Log}_2(\text{FPKM})$  dos transcritos. .... 54

**Figura 13.** *Heatmap* mostrando a expressão dos genes associados aos termos mais enriquecidos, exclusivos no conjunto de DEGs do transcritoma de *D. saccharalis*. Na figura pode visualizar-se a expressão normalizada dos DEGs relacionados com: A) Sinalização celular e transdução de sinais, B) Produção de energia pela cadeia respiratória, C) Regulação da tradução e D) Componentes estruturais da cadeia respiratória. A abreviação UNI representa *contigs* únicos para cada gene. Ca: Insetos alimentados com cana-de-açúcar. Da: Insetos alimentados com dieta artificial..... 58

**Figura 14.** *Heatmap* mostrando a expressão dos genes associados aos termos mais enriquecidos, exclusivos no conjunto de DEGs do transcritoma de *T. l. licus*. Na figura pode visualizar-se a expressão normalizada dos DEGs relacionados com: A) Metabolismo de lipídios, B) Remodelação da membrana peritrófica, C) Função antioxidante e D) Detoxificação. A abreviação UNI representa *contigs* únicos para cada gene. Ca: Insetos alimentados com cana-de-açúcar. Da: Insetos alimentados com dieta artificial. CYP: Citocromo P450..... 59

**Figura 15.** Etapas funcionais do silenciamento gênico por meio de RNA dupla fita (dsRNA) em células eucariotas. Após a importação do dsRNA para dentro das células, os dsRNAs são processados pela enzima Dicer gerando pequenos RNAs de interferência (siRNAs) que, em conjunto com a proteína Argonauta, são montados no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). O complexo RISC degrada mRNAs específicos baseado na sequência dos siRNAs. Os efeitos de RNAi sistêmico são mediados pela produção de novos dsRNAs pela polimerase dependente de RNA (RdRP), que usa o RNA alvo como molde e as fitas parcialmente degradadas de siRNA como *primers* para gerar novas moléculas de dsRNA. Os dsRNAs secundários podem ser exportados espalhando o efeito de RNAi a outras células. Adaptado de Price e Gatehouse (2008). .... 65

**Figura 16.** Esquema ilustrando os níveis relativos do hormônio juvenil e ecdisteróides em insetos holometábolos durante as últimas etapas do ciclo de vida, desde o penúltimo ínstar larval até a fase de adulto. As barras amarelas correspondem a períodos de jejum do inseto. Adaptado de Cheong *et al.* (2015)..... 73

**Figura 17.** Material usado para manutenção de *T. l. licus* e *D. saccharalis*. A) Broca-gigante em placas contendo dieta artificial. B) Broca gigante em placas contendo colmo de cana-de-açúcar. C) Frascos erlenmeyer contendo dieta artificial, para criação de brocas da cana. .... 76

- Figura 18.** Placas usadas para o bioensaio com moléculas de dsRNA em larvas de *D. saccharalis* (A) e larvas de *T. l. licus* (B). A figura apresenta o momento no qual pedaços de dieta contendo moléculas de dsRNA são administradas para as larvas. .... 82
- Figura 19.** Árvore filogenética construída usando o algoritmo Neighbor-Joining, das esterases do hormônio juvenil (JHEs) descritas em Lepidoptera e em outros insetos, além de outras esterases descritas em lepidópteros. Os transcritos similares a JHEs identificados nos transcritomas do intestino de *D. saccharalis* e *T. l. licus* estão representados pelas abreviaturas DsaJHE-like e TliJHE-like respectivamente. As caixas vermelhas indicam os genes selecionados para validação por RNAi. As abreviaturas das demais sequências com seu respectivo número de acesso e o nome completo da espécie, são as seguintes: SnoJHE1, ABW24129.1 (*Sesamia nonagrioides*); TniJHE, Q7M4E5 (*Trichoplusia ni*); BmoJHE1, NP\_001037027.1 (*Bombyx mori*); MseJHE, AJR27471.1 (*Mythimna separata*); HviJHE, AAC38822.1 (*Heliothis virescens*); MsexJHE, AAG42021.2 (*Manduca sexta*); OfuJHE, OACB12192.1 (*Ostrinia fuscidentalis*); HarJHE, AEB77712.1 (*Helicoverpa armigera*); SliJHE1, XP\_022832867.1 (*Spodoptera litura*); CfuJHE, AAD34172.1 (*Choristoneura fumiferana*); DmeJHE, AAK07833.1 (*Drosophila melanogaster*); CquJHE XP\_001863697.1 (*Culex quinquefasciatus*); AaeJHE, AAEL005200-PA (*Aedes aegypti*); AmeJHE, AAU81605.1 (*Apis melífera*); AroJHE, BAD91554.1 (*Athalia rosae*); TcaJHE, BAJ10679.1 (*Tribolium castaneum*); TmoJHE, AAL41023.1 (*Tenebrio molitor*); PhiJHE, BAE94685.1 (*Psacotha hilaris*); DrhiJHE, ATS94112.1 (*Dendroctonus rhizophagus*); BmoCCE, BAI66485.1 (*Bombyx mori*); HarCCE, ADF43475.1 (*Helicoverpa armigera*); BmoAE, NP\_001104822.1 (*Bombyx mori*); ChoCEE3, ACR56068.1 (*Cochliomyia hominivorax*). CCE: Família das Carboxil-colina-esterases. AE: Alfa esterase. CEE3: Carboxil-esterase E3..... 85
- Figura 20.** Alinhamento das sequências de aminoácidos das JHEs de *H. armigera* (HarJHE), *S. nonagrinoidea* (SnoJHE), *T. l. licus* (TliJHE) e *D. saccharalis* (DsaJHE). O motivo GQxxG, conservado em todas as JHEs descritas em insetos, está indicado na caixa vermelha. Os asteriscos (\*) indicam os três resíduos da tríade catalítica (Ser-203, Glu-334, His-448), conservados na família das esterases..... 86
- Figura 21.** Resultado da eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando as amostras de RNA total extraído das diferentes fases de desenvolvimento de: A) *D. saccharalis* e B) *T. l. licus*. 1) Ovo. 2) Larva neonata. 3) Larva de terceiro instar. 4) Larva de penúltimo instar. 5) Larva de último instar. 6) Pré-pupa. 7) Pupa. 8) Adulto. Foi utilizado como marcador de peso molecular o 1Kb Plus Ladder (Invitrogen)..... 87
- Figura 22.** Resultado do geNorm mostrando o índice de estabilidade M dos genes de referência avaliados em *D. saccharalis*. *UBQ*: Ubiquitina. *E2F*: fator de elongação II. *βtub*: β-tubulina. *GADPH*: Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase. *βAct*: β-Actina. *RPS10*: Proteína ribossomal S10..... 88
- Figura 23.** Perfil de expressão do gene *jhe* nos diferentes estágios de desenvolvimento de: A) *D. saccharalis* e B) *T. l. licus*. As letras acima das barras representam os diferentes grupos com diferenças estatisticamente significativas entre si (Valor P < 0,05; TS test). L3: Larva de terceiro instar. L5: Larva de penúltimo instar. L6: Larva de último instar. O valor de expressão relativa 1 corresponde ao 100% de expressão do gene..... 89
- Figura 24.** Expressão do gene *jhe* no intestino de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, em referência à carcaça. Os asteriscos (\*\*\*) representam o nível de significância estatística (Valor P < 0,001. TS test) entre as amostras de intestino e carcaça de *T. l. licus*. O valor de expressão relativa 1 corresponde ao 100% de expressão do gene. .... 91

**Figura 25.** Resultado da eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando os fragmentos purificados de dsRNA, sintetizados *in vitro* para serem usados nos bioensaios com *D. saccharalis* e *T. l. licus*. A) dsTljhe. B) dsDsjhe. O rendimento médio da expressão *in vitro* das moléculas de dsRNA foi de 80 µg por reação..... 92

**Figura 26.** Expressão relativa do gene *jhe* de *T. l. licus*, em resposta à administração de moléculas de dsRNA por meio de: A) Entrega oral e B) Microinjeção. Os asteriscos (\*\*\*) representam o nível de significância estatística (Valor P < 0,001; TS test), entre as amostras de insetos tratados com dsTljhe e as amostras controle tratadas com dsGFP, para cada dose de dsRNA respectivamente. Nenhum dos insetos tratados com as diferentes doses de dsGFP apresentou diferenças significativas em relação aos insetos controle, tratados com Tris 10mM (pH 8,0). O valor de expressão relativa 1 corresponde ao 100% de expressão do gene. .... 93

**Figura 27.** Expressão relativa do gene *jhe* de *D. saccharalis*, em resposta à administração de moléculas de dsRNA por meio de: A) Entrega oral e B) Microinjeção. Os asteriscos (\*) representam o nível de significância estatística (\*\*: Valor P<0,01, \*\*\*: Valor P<0,001; TS test), entre as amostras de insetos tratados com dsDsjhe e as amostras controle tratadas com dsGFP, para cada dose de dsRNA respectivamente. Os asteriscos sublinhados (\*) indicam diferenças significativas entre as amostras dos indivíduos tratados com uma determinada dose de dsGFP, e os indivíduos controle tratados com Tris 10mM (pH 8,0). O valor de expressão relativa 1 corresponde ao 100% de expressão do gene. .... 94

**Figura 28.** Expressão relativa do gene *jhe* em diferentes tempos após a entrega oral de moléculas de dsRNA. A) *T. l. licus* e B) *D. saccharalis*. Os asteriscos (\*) representam o nível de significância estatística (Valor P<0,05; TS test) entre as amostras de insetos tratados com dsDsjhe ou dsTljhe, e as amostras controle tratadas com dsGFP, para cada tempo de detecção respectivamente. Os asteriscos sublinhados (\*) indicam diferenças significativas entre as amostras dos organismos tratados com dsGFP, e as larvas controle tratadas com Tris 10mM (pH 8,0). As letras representam os grupos que apresentaram diferenças significativas (Valor P<0,05; ANOVA e TSD) entre si, nos diferentes tempos de detecção após a entrega das moléculas de dsTljhe ou dsDsjhe. O valor de expressão relativa 1 corresponde ao 100% de expressão do gene. .... 96

**Figura 29.** Expressão relativa do gene *jhe* em intestino e carcaça, em resposta à administração oral de moléculas de dsRNA. A) *T. l. licus* e B) *D. saccharalis*. Os asteriscos representam o nível de significância estatística (\*: Valor P<0,05, \*\*: Valor P<0,01, \*\*\*: Valor P<0,001; TS test) entre as amostras de insetos tratados com dsDsjhe ou dsTljhe e as amostras controle tratadas com dsGFP, para cada tecido e dose de dsRNA respectivamente. Os asteriscos sublinhados (\*) representam as doses que apresentaram diferenças significativas (Valor P<0,05; ANOVA e TSD) entre intestino e carcaça. O valor de expressão relativa 1 corresponde ao 100% de expressão do gene. .... 98

**Figura 30.** Porcentagem média de mortalidade máxima das larvas de penúltimo e último ínstar, tratadas com duas doses de diferentes quantidades de dsRNA administradas por via oral. A) *T. l. licus* e B) *D. saccharalis*. Os asteriscos (\*) representam os tratamentos com diferenças significativas (Valor P < 0,05; ANOVA e TSD), em comparação com seu respectivo controle com dsGFP. .... 100

**Figura 31.** Porcentagem média de mortalidade ao longo dos vinte dias, para os bioensaios realizados usando duas aplicações (doses) de 5 µg de dsTljhe, administrados por via oral em larvas de penúltimo e último ínstar de *T. l. licus*. Na figura estão sinalizados com setas, os dias em que foi atingida a mortalidade máxima (PMM). .... 101

- Figura 32.** Média do comprimento total das larvas de penúltimo e último ínstar de *T. l. licus* tratadas com duas aplicações de diferentes quantidades de dsRNA. Os dados apresentados correspondem ao dia 15 após a ingestão da dieta contendo a primeira aplicação das moléculas de dsRNA. O asterisco (\*) representa o tratamento com diferenças significativas (Valor  $P < 0,05$ ; ANOVA), em comparação ao controle com dsGFP. .... 102
- Figura 33.** Efeito fenotípico associado à supressão do gene *jhe* em larvas de penúltimo ínstar de *T. l. licus*. A figura mostra as diferenças morfológicas das larvas em vista dorsal, em diferentes tempos após a ingestão das moléculas de dsTljhe (hora zero). T: Larvas tratadas com duas doses de 5 µg de dsTljhe. C: Larvas tratadas com duas doses de 5 µg de dsGFP. 102
- Figura 34.** Efeito fenotípico associado à supressão do gene *jhe* em larvas de último ínstar de *T. l. licus*. A figura ilustra as diferenças morfológicas das larvas (em vista dorsal) e das pupas (em vista lateral), em diferentes tempos após a ingestão das moléculas de dsRNA (hora zero). T: Larvas tratadas com duas doses de 5 µg de dsTljhe. C: Larvas tratadas com duas doses de 5 µg de dsGFP. .... 103
- Figura 35.** Ausência de efeito fenotípico associado à supressão do gene *jhe* em larvas de penúltimo ínstar de *D. saccharalis*. A figura ilustra larvas (em vista dorsal) e pupas (em vista lateral), em diferentes tempos após a ingestão das moléculas de dsRNA (0 horas). T: Larvas tratadas com duas doses de 5µg de dsDsjhe. C: Larvas tratadas com duas doses de 5 µg de dsGFP. .... 104
- Figura 36.** Comportamento alimentar associado à supressão do gene *jhe* em larvas de penúltimo ínstar de *T. l. licus*. Pode observar-se uma interrupção na alimentação das larvas tratadas, e uma conseqüente deficiência nutricional refletida em um crescimento anormal. Por outro lado, as larvas tratadas com dsGFP, alimentaram-se e cresceram normalmente. Dieta fresca foi fornecida para os insetos nos dias 5, 8 e 12. T: Larvas tratadas com duas doses de 5 µg de dsTljhe. C: Larvas tratadas com duas doses de 5 µg de dsGFP. .... 106

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Número total de reads pareados em cada fase do pré-processamento das oito bibliotecas obtidas por sequenciamento Illumina Hi-seq2500, para <i>T. l. licus</i> e <i>D. saccharalis</i> . .....	43
<b>Tabela 2.</b> Número total de transcritos montados a partir das 8 bibliotecas de cDNA, sequenciadas a partir do intestino de <i>T. l. licus</i> e <i>D. saccharalis</i> . .....	44
<b>Tabela 3.</b> Número total de termos GO associados aos DEGs, observados nos transcritomas de intestino de <i>T. l. licus</i> e <i>D. saccharalis</i> . .....	50
<b>Tabela 4.</b> Pesquisas recentes mostrando a produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga, por meio do uso de RNAi. ....	69
<b>Tabela 5.</b> Genes usados para as análises de expressão por qRT-PCR, com seus <i>primers</i> correspondentes. Fw: corresponde ao <i>primer</i> senso. Rv: corresponde ao <i>primer</i> antisenso. ...	78

## Abreviaturas

.fa – Formato fasta

°C – Graus celsius

µg/µl – Microgramas por microlitro

µg/cm<sup>3</sup> – microgramas por centímetro cúbico

µM – Micromolar

20E – 20-Hidroecdisona

ABC – *ATP-binding cassette transporter*

ATP – Trifosfato de adenosina

B.O.D – Demanda Bioquímica de Oxigênio

Bt – *Bacillus thuringiensis*

CA – *Corpora Allata*

cDNA – DNA complementar

CEs – Carboxilesterases

cm – Centrimetros

*Contigs* – Sequências contíguas

Cq – *Quantification cycle*

CTC – Centro de Tecnologia Canaveira

CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

ddNTP – Dideoxynucleotídeo

DEGs – *Differentially expressed genes*

DEPC – Dietilpirocarbonato

dNTP – Deoxynucleotídeo

dsDsjhe – Molécula de dsRNA específica para o gene *jhe* identificado para *D. saccharalis*

dsGFP – Molécula de dsRNA específica para o gene que codifica a proteína verde fluorescente

Dsjhe – Gene *jhe* identificado para *D. saccharalis*

dsRNA – RNA dupla fita

dsTljhe – Molécula de dsRNA específica para o gene *jhe* identificado para *T. l. licus*

E.C – Código de classificação enzimática

E2F – Fator de elongação II

*Fc* – *Fold change*

FDR – *False discovery rate*

FoxO – Fatores de transcrição *Forkhead box*

FPKM – *Fragments Per Kilobase per Million mapped reads*

g – gramas

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GC – Guanina-Citosina

GM – Geneticamente modificado

GO – *Gene ontology*

GSTs – Glutathionas S-transferases

h – Horas  
HIF-1 – *Hypoxia-inducible factors*  
JH – Hormônio Juvenil  
JHDK – Diol quinase  
JHE – Esterase do Hormônio Juvenil  
JHEH – Epóxido hidrolase  
JTT – Matriz de aminoácidos Jones-Taylor-Thornton  
kcat – Constante de renovação  
KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes  
kg/há – Quilograma por hectare  
Km – constante de Michaelis  
M – Molar  
MCT – Média do comprimento total  
mg – miligramas  
MIP – Manejo Integrado de Pragas  
miRNAs – Micro-RNAs  
mL – Mililitros  
mm – Milímetros  
mM – Milimolar  
MP – Membrana peritrófica  
mRNA – RNA mensageiro  
mTOR – *mechanistic target of rapamycin*  
NCBI – National Center for Biotechnology Information  
ncRNA – RNA não-codificante  
ng – nanogramas  
NGS – *Next Generation Sequencing*  
nr – Não redundante  
OGM – Organismo Geneticamente Modificado  
ORF – *Open Reading Frame*  
P450 – Citocromo P450  
pb – pares de bases  
PCR – *Polymerase Chain Reaction*  
pH – Potencial hidrogeniônico  
*Primers* – Oligonucleotídeos iniciadores  
PRR – Porcentagem de redução relativa de expressão  
PRRs – *Pattern recognition receptors*  
qRT-PCR – PCR em tempo real  
R<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação  
RdRP – RNA-polimerase dependente de RNA  
*Reads* – Sequências de nucleotídeos curtas

RISC – *RNA-induced silencing complex*  
RNAi – RNA interferente  
RPKM – *Reads Per Kilobase per Million mapped reads*  
RPS10 – Proteína ribosomal S10  
RPS18 – Proteína ribosomal S18  
rRNA – RNA ribosomal  
SID – *Systemic RNA Interference Deficiency*  
siRNA – *Small Interfering RNA*  
SWEET1 – Transportador bidirecional de açúcares SWEET1  
Tljhe – Gene jhe identificado para *T. l. licus*  
TMM – *Trimmed mean of M-values*  
TPP – *Tissue Culture Test Plates*  
Tret1 – Transportador de trealose  
TS – Séries de Taylor  
TSD – Teste de comparação múltipla de Tukey  
U – Unidades  
UBQ – Ubiquitina  
UGTs – Glucuronosiltransferases  
UNI – *Contigs* únicos  
UV – Ultravioleta  
VSG – *Variant surface glycoprotein*  
 $\beta$ ACT – Beta actina  
 $\beta$ -TUB – Beta tubulina  
 $\mu$ g – Microgramas  
 $\mu$ L – Microlitros

## Resumo

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes no Brasil para a produção tanto de açúcar quanto de etanol de segunda geração. Os ataques dos insetos-praga, broca-da-cana (*Diatraea Saccharalis*, Fabricius 1770) e broca-gigante da cana (*Telchin licus licus*, Drury 1770), reduzem a produtividade nas lavouras gerando perdas de milhões de dólares por ano para a indústria canavieira no país. Os métodos de controle utilizados atualmente têm se mostrado insuficientes para evitar os prejuízos produzidos por essas pragas. A ferramenta de RNA interferente (RNAi) considera-se promissora para o controle de insetos-praga, isto, mediante a utilização de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) para silenciar genes essenciais para a sobrevivência do inseto. No presente trabalho, foi determinado o transcrito das pragas da cana-de-açúcar mencionadas, visando a identificação de genes potenciais para silenciamento e validação de moléculas de dsRNA para o controle desses insetos. A partir do sequenciamento (RNA-seq) e análise *in silico* do transcrito do intestino médio de larvas tratadas com diferentes dietas (cana-de-açúcar e dieta artificial), foram gerados bancos de dados com um total de 49.225 e 53.108 *contigs* dentre os quais 1.872 e 2.465 foram diferencialmente expressos (EdgeR), para *D. saccharalis* e *T. l. licus*, respectivamente. A análise de enriquecimento por ontologia genica (GO) permitiu a identificação de genes que estão envolvidos, principalmente, com as vias de detoxificação, de transporte de moléculas, de digestão e de regulação hormonal. Para validação das moléculas de dsRNA, foram selecionadas as sequências dos genes que codificam a esterase do hormônio juvenil (JHE). Essa enzima regula os processos de muda e metamorfose do inseto por meio da degradação controlada do hormônio juvenil. O silenciamento do gene *jhe* utilizando uma concentração de dsRNA de 10 $\mu$ g/cm<sup>3</sup> de dieta não apresentou mortalidade em larvas de *D. saccharalis*, mas apresentou mortalidade de até 60% em larvas de penúltimo ínstar de broca-gigante. O presente estudo é de grande relevância, uma vez que foi possível identificar pela primeira vez a resposta de RNAi para *T. l. licus* e mostrar a eficiência das moléculas de dsRNA desenhadas, para o controle deste inseto praga. Finalmente, cabe destacar que os dados gerados poderão ser usados em futuros estudos para desenhar novas moléculas de dsRNA potenciais para o controle da broca da cana e da broca-gigante.

**Palavras chave:** RNA interferente, esterase do hormônio juvenil, broca da cana-de-açúcar, broca-gigante da cana-de-açúcar, transcrito.

## Abstract

Sugarcane is one of the most important crops in Brazil, utilized for sugar and second-generation biofuel production. Damage caused by the pests, sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*, Fabricius 1770) and sugarcane giant borer (*Telchin licus licus*, Drury 1770), reduces crop yield that cause millions of dollars loss annually to the sugarcane industry. Currently used pest management approaches have failed to reduce the damages caused to sugarcane crops. RNA interference (RNAi) is an alternative biotechnological tool for pest management, that uses double-stranded RNA molecules (dsRNA) to knock-down essential genes required for the insect survival. In this work, transcriptomes from sugarcane borer and sugarcane giant borer were obtained, for the identification of target genes for RNAi and further validation of dsRNA molecules. Sequencing (RNA-seq) and *in silico* analysis of midgut transcriptome obtained from larvae treated on different diets (Sugarcane and artificial diet), generated a transcript database containing 49.225 and 53.108 contigs, amongst which 1.872 and 2.465 were differentially expressed (EdgeR), for *D. saccharalis* and *T. l. licus*, respectively. GO Enrichment analysis allowed identification of genes involved, mainly with detoxification pathways, molecular transport, digestion and hormonal regulation. In order to validate dsRNA molecules via oral delivery, gene sequences coding for juvenile hormones esterase (JHE) were selected. This enzyme regulates molting and metamorphosis process in insects, by controlled degradation of juvenile hormone (JH). Knock-down of JHE gene, using a 10 µg dosage of dsRNA, did not result in lethal effects for *D. saccharalis* larvae. Nevertheless, the same amount of dsRNA was lethal for penultimate instar of sugarcane giant borer larvae, achieving approximately 60% mortality rate. The current work is very significant, since it's the first report of RNAi characterization in *T. l. licus* that show efficiency of specific dsRNA molecules reducing survival of this insect pest. Furthermore, the data generated here can also be used for validation of other potential dsRNA molecules for *D. saccharalis* and *T. l. licus* management.

**Keywords:** RNA interference, juvenile hormone esterase, sugarcane borer, sugarcane giant borer, transcriptome.

## 1. Introdução Geral

### 1.1 Cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta monocotiledônea pertencente à família Gramineae, do gênero *Saccharum* (Daniels e Brian, 2015). O gênero *Saccharum* é constituído por diferentes espécies, dentre elas: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum* e *S. barberi* (Mazambani *et al.*, 2006). Por causa de doenças e problemas de adaptação ecológica sofridos por essas cultivares, a cana-de-açúcar cultivada comercialmente é um híbrido proveniente originado dos cruzamentos das espécies acima mencionadas, recebendo assim a denominação de *Saccharum spp* (Daniels e Brian, 2015). O procedimento de produção do açúcar a partir da cana é de origem antiga, desenvolvido na Índia por volta de 3.000 a.C. e depois adotado pelos países árabes. A tecnologia se espalhou pelo mundo por meio das invasões árabes ao continente europeu, que introduziram a cultura na região do Mar Mediterrâneo. Anos depois, a cana-de-açúcar chegou ao continente americano por meio dos navegantes espanhóis e portugueses. Atualmente, é cultivada em mais de 90 países e constitui uma das principais culturas do planeta (Cesnik e Miocque, 2004).

A de cana-de-açúcar tem grande importância comercial em todo o mundo, contribuindo com aproximadamente 78% de todo o açúcar produzido. Além da produção de açúcar obtido por procedimentos de decantação e cristalização do caldo de cana, a etapa de fermentação do caldo resulta em produção de etanol. Este produto é utilizado principalmente como combustível de forma alternativa aos combustíveis fósseis e sua produção tem se mostrado altamente promissora sendo considerada uma fonte de energia renovável (Elbehri *et al.*, 2013). A importância da cana-de-açúcar pode ser atribuída à sua múltipla utilização, pois além dos produtos principais mencionados anteriormente, os subprodutos bagaço, vinhaça e torta de filtro possuem um impacto significativo na geração de energia, produção de ração animal, produtos aglomerados, fertilizantes, dentre outros (Macedo, 2005).

A parte aérea da planta é formada por colmos, folhas, inflorescências e frutos; e a subterrânea, é constituída por raízes e rizomas. O colmo representa a estrutura de maior interesse comercial por produzir os altos conteúdos de açúcar, dos quais é obtido o caldo de cana. O colmo é formado por nós bem definidos e entrenós diferentes, sustentando as folhas e panículas nas partes aéreas da planta (Mazambani *et al.*, 2006). Apesar de ser uma planta perene na sua forma natural, o cultivo de cana-de-açúcar é realizado de maneira semi-perene, o que

significa que a reforma do canavial é feita apenas após 4 a 5 anos de utilização comercial. Dessa forma, ocorre uma diminuição do número de plantas e o desenvolvimento reduzido das remanescentes devido, principalmente, a aparição de doenças e problemas ecológicos. Este fator implica o uso de variedades geneticamente resistentes às principais pragas e doenças da cultura, como única estratégia economicamente viável para manter o sucesso de produção da cana-de-açúcar (Macedo, 2005).

## **1.2 Cultura canavieira no Brasil**

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes do agronegócio brasileiro. Durante várias décadas, o Brasil tem sido o maior produtor de cana do mundo, e atualmente é o segundo maior produtor de etanol, depois dos Estados Unidos. O seu cultivo foi iniciado em fins do século XVI por centenas de engenhos nos estados de Pernambuco e Bahia, e espalhando-se rapidamente pelo restante do país até a região sudeste, tornando-se uma das culturas mais importantes do país em um curto período de tempo (Ramos, 2008).

No que se refere à exportação, o Brasil é responsável pela produção de mais da metade de todo o açúcar comercializado no mundo. A cultura de cana-de-açúcar representa para o Brasil não somente um pilar fundamental na produção de açúcar, mas também na geração de etanol. A estimativa da área destinada à atividade sucroalcooleira para a safra 2017/18 é de 8.766,5 mil hectares, com uma produtividade de 73.728 kg/ha, registrando um incremento de 1,5% em relação à safra anterior (Conab, 2017).

De acordo com Conab (2017), o aumento na produção é devido ao investimento tecnológico nas unidades de produção, uso das variedades mais produtivas e de melhores tratamentos culturais. No total, a região Centro-Sul do Brasil é responsável por 86,1% e a região Norte-nordeste, 14,9% da produção da cana-de-açúcar. As lavouras de cana-de-açúcar têm se expandido anualmente em todo o país. O maior percentual de aumento está na região Sudeste. Outra região que apresentou crescimento significativo na expansão da área de cultivo foi a Centro-Oeste. Na região Nordeste, o cultivo da cana-de-açúcar se limitou, desde a colonização, às zonas litorâneas e ao Agreste, onde a precipitação possibilitava o desenvolvimento da cultura. Desta forma, as duas regiões produtoras (Nordeste e Centro-Sul), cultivadas com safras alternadas, permitem uma constante produção de cana de açúcar, ao longo de todo o ano, colocando o Brasil em uma posição vantajosa, para atender às necessidades de maiores exportações (De Oliveira *et al.*, 2015).

No entanto, embora a produtividade média brasileira da cana-de-açúcar tenha crescido de forma significativa nos últimos anos, existem estudos mostrando que apesar dos avanços tecnológicos, a cultura ainda enfrenta uma série de problemas fitossanitários, grande parte deles causados por insetos-praga (Barbosa *et al.*, 2014; Barbosa *et al.*, 2015).

### **1.3 Controle de pragas na cultura da cana-de-açúcar**

O mercado sucro-energético no Brasil enfrenta diversos desafios para continuar aumentando sua produtividade sem expandir a plantação de cana-de-açúcar para as áreas de recursos naturais. Controle de pragas é um dos mais importantes desafios. Como consequência do aumento da área plantada de monocultura, a incidência de pragas nos canaviais tem aumentado significativamente nas últimas duas décadas. Os insetos representam a maior parte das pragas que atacam a cana-de-açúcar. As pragas mais importantes da cultura são a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* Fabr. 1794; (Lepidoptera: Crambidae), a broca-gigante da cana-de-açúcar *Telchin licus licus* Drury, 1770; (Lepidoptera: Castniidae), a cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata* Stal, 1854; (Hemiptera: Cercopidae) e os cupins *Heterotermes tenuis* Hagen, 1858; (Isoptera: Rhinotermitidae). Existem outras espécies que causam prejuízos em menor magnitude como por exemplo: *Sphenophorus levis* Varrie 1978; (Coleoptera: Curculionidae), as formigas cortadeiras saúvas (*Atta spp.*), quenquéns (*Acromyrmex spp.*), a cigarrinha-das-folhas *Mahanarva posticata* Stal, 1855; (Hemiptera: Cercopidae) (Pinto *et al.*, 2006).

Algumas dessas pragas são particularmente difíceis de se controlar devido ao hábito endofítico, que permite o seu desenvolvimento, durante a maior parte do ciclo de vida, dentro do colmo da cana, dificultando o contato direto com pesticidas e impossibilitando o controle manual de forma viável em termos de custo-benefício da produção (Gallo *et al.*, 2002). Em resposta às novas normativas que regulam o uso de pesticidas sintéticos, além da baixa eficácia dos mesmos no controle de pragas de hábito endofítico, algumas alternativas têm sido implementadas nos últimos anos, visando o controle das pragas da cana-de-açúcar. O desenvolvimento de novas cultivares por meio de inter cruzamentos visando aumentar a resistência para insetos-praga é uma dessas alternativas. Porém, a variabilidade genética em referência ao número de cromossomos nas espécies do gênero *Saccharum*, dificulta a obtenção de cultivares com características desejadas, devido principalmente ao fato da segregação de genes selecionados não acontecer de forma uniforme (Lakshmanan *et al.*, 2005).

Uma outra alternativa muito explorada no combate a diversas pragas agrícolas em todo o mundo é o uso do controle biológico, técnica que explora outros organismos vivos como inimigos naturais, parasitas, ou organismos com atividade entomotóxica, com a finalidade de diminuir as populações de insetos-praga para níveis abaixo do limiar de perda econômica. Na cultura canavieira existem muitos exemplos de organismos que podem ser utilizados para o controle de diversas pragas, dentre eles: os parasitóides de ovos *Trichogramma galloi* (Zucchi, 1988; Hymenoptera: Trichogrammatidae) *Anagrus urichi* (Pickles, 1932; Hymenoptera: Mymaridae) e *Acmopolymena hervali* (Gomes, 1948; Hymenoptera: Mymaridae), a vespinha *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891; Hymenoptera: Braconidae), a mosca predadora de ninfas *Salpingogaster nigra* (Schiner, 1868; Diptera: Syrphidae); os fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Batkoa apiculata*; e a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Pinto *et al.*, 2006). Entretanto, o uso de controle biológico se torna insuficiente dependendo da capacidade de adaptação dos organismos de controle às condições climáticas específicas de cada plantio. Como parte da estratégia de Manejo Integrado de Pragas (MIP), é recomendável a aplicação conjunta de agentes de controle biológico, produtos biotecnológicos e melhoramento genético, para manter a produção de forma sustentável (Barbosa *et al.*, 2015).

O melhoramento genético é uma das estratégias mais utilizadas para gerar variedades de cana-de-açúcar resistentes a insetos-praga. Porém, o melhoramento genético tradicional requer muito tempo para sua implementação, impedindo desta forma atingir as altas demandas da indústria canavieira. Por outro lado, o melhoramento genético fundamentado no uso da biotecnologia, vem se tornando cada vez mais aceitável e explorado, chegando a ser muitas vezes, uma necessidade. Os avanços em conhecimento de diferentes áreas das Ciências Biológicas como a Biologia Molecular e a Engenharia Genética permitiram o desenvolvimento de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs). No caso de plantas de grande interesse econômico, foi possível desenvolver cultivares GM expressando características específicas que concedem vantagens no *fitness* reprodutivo, em relação a cultivares não modificadas geneticamente (Nóbrega e Dornelas, 2006).

Nesse contexto, o Brasil, como um dos líderes mundiais na produção de plantas modificadas geneticamente, investe fortemente no melhoramento genético da cana-de-açúcar por meio de o uso da biotecnologia. Esta ferramenta se tornou uma das principais abordagens para manter o Brasil em sua atual posição privilegiada na indústria canavieira no contexto internacional (Catalan, 2015). Com isso, atualmente estão sendo produzidas variedades de cana-

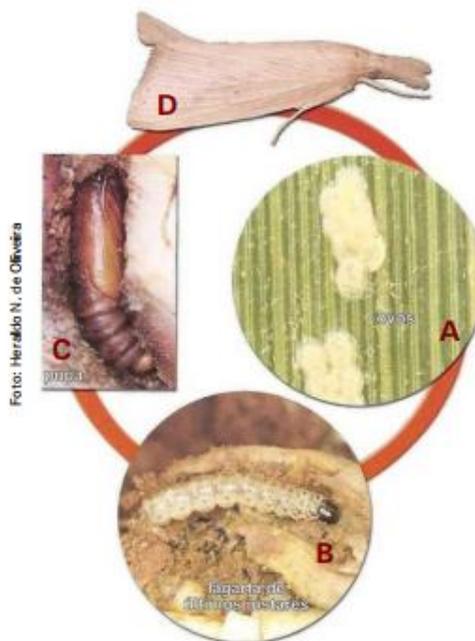
de-açúcar no Brasil com resistência a duas pragas: broca da cana (*D. saccharalis*) e broca-gigante da cana (*T. l. licus*), as quais possuem habito endofítico e geram efeitos devastadores nos plantios de cana nas principais regiões produtoras do país (Carvalho *et al.*, 2013; Dinardo-Miranda *et al.*, 2013).

#### **1.4 Broca da cana-de-açúcar**

*Diatraea saccharalis* (Fabricius) é uma das 21 espécies do gênero *Diatraea*, família Crambidae pertencente ao grupo de mais de 50 espécies da ordem Lepidoptera que ocorrem naturalmente na cana-de-açúcar, muitas delas tornado-se pragas importantes da cultura. A broca da cana é considerada a praga de maior importância para a cultura de cana no continente americano e encontra-se distribuída desde os Estados Unidos até a América do Sul (Long e Hensley, 1972). No Brasil, a presença da broca da cana foi identificada em todos os estados onde é cultivada a cana-de-açúcar, representando o principal inseto praga dos canaviais brasileiros e causando perdas de até 1 bilhão de dólares por ano (Mendonça *et al.*, 1996; De Almeida, 2016). Além da cana-de-açúcar, a *D. saccharalis* ataca outras gramíneas como: sorgo, milho, arroz, aveia, cevada, trigo e algumas ciperáceas (Long e Hensley, 1972).

Como todo inseto holometábolo, isto é, que tem metamorfose completa, o ciclo de vida da broca da cana ocorre em quatro fases principais: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). O ciclo completo dura de 50 a 60 dias, dividido em: 4-9 dias na fase de incubação do ovo, 30-40 dias na fase larval, 9-14 dias na fase de pupa e finalmente o adulto que pode sobreviver até 10 dias (Botelho, 1985). Os ovos apresentam formato oval e achatado com coloração amarelo-claro nos primeiros dias, entretanto, no fim do período de incubação os ovos adquirem tonalidade marrom-escuro (Lima Filho e Lima, 2001).

Após a eclosão, a lagarta alimenta-se por meio da raspagem das folhas ou da casca do entrenó em formação. Geralmente só depois da segunda ecdise, a larva inicia a perfuração do colmo próximo à base do entrenó, formando túneis e galerias de formato circular que atravessam o colmo da cana em sentido transversal (Botelho e Macedo, 2002). O número de fases larvais varia entre 5 e 6, e no seu último ínstar, as lagartas podem chegar a medir entre 22 e 25 mm de comprimento. Apresentam coloração amarelo-claro com manchas marrons e pretas em formato circular e cabeça marrom. As larvas possuem três pares de pernas torácicas, quatro pares de pseudópodes abdominais e um par de pseudópodes anais (Gallo *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Principais fases de desenvolvimento da broca da cana-de-açúcar (*D. saccharalis*). A) Ovos (Postura). B) Larva de quinto ínstar. C) Pupa em fase avançada. D) Adulto. Adaptado de Cruz (2007).

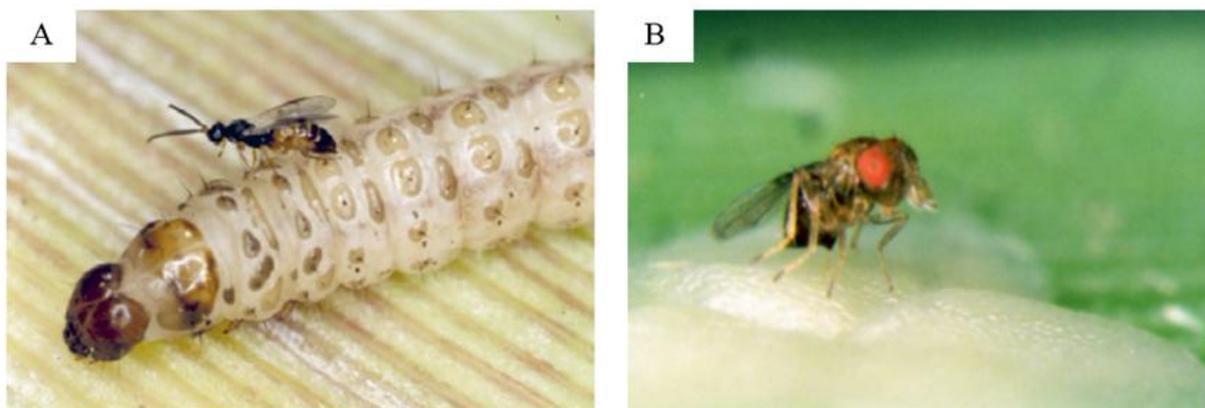
As pupas medem aproximadamente 17 mm de comprimento e 4 mm de largura. Inicialmente, possuem coloração marrom clara e escurecem conforme o período de pupa chega ao fim. Geralmente, as pupas se localizam nas aberturas dos túneis envolvidas por um casulo de seda. O adulto emerge pelo orifício do túnel, medindo aproximadamente 25 mm de envergadura, com as asas anteriores apresentando coloração amarelo-palha e as asas posteriores esbranquiçadas (Gallo *et al.*, 2002). Os adultos apresentam uma maior atividade durante a noite, momento no qual acontece a cópula. Antes do amanhecer, as fêmeas ovipositam as massas de ovos, tanto na face inferior quanto na superior do limbo foliar (Lima Filho e Lima, 2001).

O dano causado pela broca da cana ocorre durante a fase larval, fase de maior período do desenvolvimento do inseto. Logo no primeiro estágio larval, as lagartas começam a se alimentar das folhas mais jovens que ainda não se expandiram, destruindo o meristema apical da planta e causando uma condição conhecida como “coração morto” (Gallo *et al.*, 2002). As galerias abertas pelo inseto podem causar a perda de tecidos, o tombamento da planta, enraizamento aéreo e germinação das gemas laterais. Além da ação direta das larvas enfraquecer a planta, as galerias também causam efeitos indiretos altamente prejudiciais para a cultura como a invasão de organismos oportunistas, fungos e bactérias, responsáveis pela podridão vermelha que causa a hidrólise da sacarose nos açúcares frutose e glicose (inversão de sacarose), açúcares

com menor valor energético e leva a uma redução no rendimento da produção de etanol (Long e Hensley, 1972).

Como mencionado anteriormente, o hábito endofítico do inseto dificulta seu controle por meio de o uso tradicional de pesticidas. Isso faz com que os produtores aumentem a quantidade e o número de aplicações do agente químico de forma que a rentabilidade diminua consideravelmente, além de ser prejudicial para o meio ambiente e para a saúde humana (Reay-Jones *et al.*, 2005). Embora o controle químico seja utilizado em certas regiões, sua implementação é bastante polêmica e está restrita a áreas que apresentam níveis de infestação muito altos (Dinardo-Miranda *et al.*, 2013). Abordagens de controle cultural, como adoção de variedades tolerantes ao ataque da praga, ou isolamento dos plantios, também são usadas no Brasil. Porém, essa estratégia não é viável para produção de grandes hectares da cultura (Gallo *et al.*, 2002).

Uma das ferramentas melhor explorada no Brasil para o controle da broca da cana é por meio de controle biológico. Existem diferentes organismos que são utilizados como controladores da broca da cana. Dentre eles os parasitóides têm apresentado maior sucesso nos últimos anos. Os parasitoides mais estudados são as vespas *Trichogramma galloi* e *Cotesia flavipes* (Figura 2) (Pinto, 1999; Nava *et al.*, 2009). A liberação de parasitóides no Brasil ocorre desde a década de 1970 e durante várias décadas se mostrou como a principal ferramenta no controle eficiente das larvas de *D. saccharalis* (Botelho e Macedo, 2002). Porém, o uso desses predadores naturais está limitado em algumas regiões do Brasil (principalmente áreas de baixa umidade na região do Nordeste) onde as condições não favorecem o desenvolvimento do parasitoide, causando baixa taxa de predação (Parra e Zucchi, 2004).



**Figura 2.** Parasitoides da broca da cana (*D. saccharalis*). A) *Cotesia flavipes* parasitando lagarte de quinto ínstar. B) *Trichogramma galloi* parasitando massa de ovos. Adaptado de Nava *et al.* (2009).

Como alternativa ao controle biológico, surgiu o uso de ferramentas biotecnológicas para a produção de plantas de cana-de-açúcar transgênicas resistentes a broca da cana. No Brasil, o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) vem trabalhando desde 2015 na produção de eventos de cana-de-açúcar modificada geneticamente para produzir uma potente toxina Cry (Cry 1AB) específica para broca da cana que seja eficiente no controle da praga e inócua para seres humanos e outros mamíferos. Este cultivar foi recentemente aprovado para comercialização pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), tornando o Brasil o primeiro país a produzir uma variedade transgênica de cana-de-açúcar resistente a insetos-praga (Ebc, 2017).

As toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) se apresentam como uma tecnologia eficiente e altamente específica, principalmente para controlar insetos-praga da ordem Lepidoptera (Davalos *et al.*, 2015). Outros trabalhos relatando o desenvolvimento de variantes de cana-de-açúcar transgênica resistentes a *D. saccharalis* já foram realizados usando a tecnologia de toxinas *Bt* (Lopes *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Apesar de ser uma tecnologia eficiente, já existem casos de insetos resistentes em outras culturas transgênicas de vários países que utilizam culturas *Bt*. Dessa maneira, o desenvolvimento e aplicação de uso de novas estratégias moleculares alternativas é essencial para evitar ou retardar a aparição de resistência por parte do inseto e também, permitir o controle populacional de insetos de uma maneira segura tanto para a saúde humana, quanto para o meio ambiente (Davalos *et al.*, 2015).

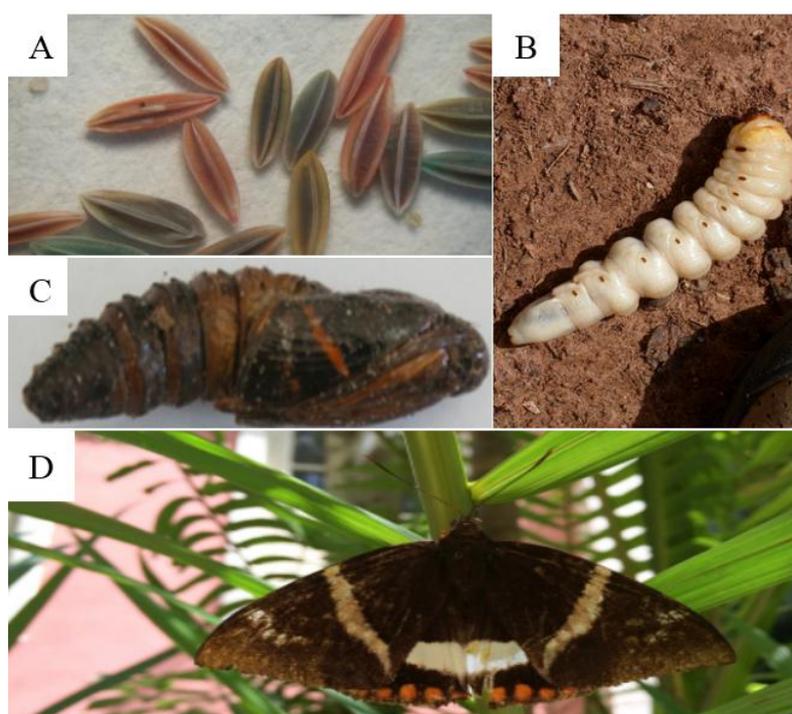
### **1.5 Broca-gigante da cana-de-açúcar**

Entre os insetos-praga que atacam a cana-de-açúcar, a broca-gigante (*T. l. licus*) é um dos que maior prejuízo gera na produtividade da cultura, causando efeitos que chegam a comprometer a sobrevivência da planta. Além do Brasil, esta espécie está distribuída em vários países da América Latina, como Colômbia, Equador, Peru, Venezuela, Trindade, Costa Rica, Panamá, Guiana e Suriname. A introdução desta praga no Brasil ocorreu provavelmente por meio de mudas de plantas ornamentais (gramíneas silvestres e orquídeas), hospedeiras naturais das quais é originária a praga. Posteriormente, com a introdução de espécies exóticas como as bananeiras e a própria cana-de-açúcar, o inseto adaptou-se a essas novas culturas (De Almeida e Arrigoni, 2009).

Atualmente no Brasil, a broca-gigante representa um dos principais problemas que a indústria canavieira enfrenta nas regiões Norte e Nordeste, especialmente nos estados de

Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Pará e Amapá. Nestas áreas, o inseto causa perdas de até 60% na produção total de cana-de-açúcar (Negrisoli *et al.*, 2015). A existência de relatos da presença da broca-gigante no estado de São Paulo, principal região produtora do país, tem gerado um alerta ainda maior, sobre a ameaça que esta espécie representa para a indústria canavieira. Têm sido estimadas perdas de até 130 milhões de reais por safra no estado de São Paulo, caso não sejam desenvolvidas estratégias eficientes para o controle da broca-gigante (Nicola *et al.*, 2008).

A broca-gigante da cana-de-açúcar pertence à ordem Lepidoptera, subordem Glossata, série Ditrysia, superfamília Castnioidea, família Castniidae e subfamília Castniinae fazendo parte de um complexo de três subespécies das quais unicamente *T. l. licus* é praga da cana-de-açúcar (Moraes e Duarte, 2009). O ciclo de vida apresenta quatro estágios principais de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 3). Geralmente, o inseto completa seu ciclo em 180 dias, embora esse período pode aumentar para o dobro dependendo de condições externas como temperatura e umidade. Depois de 15 dias iniciais de incubação na fase de ovo, a maior parte do ciclo deste inseto acontece na fase larval, passando por cinco ínstares larvais que podem durar entre dois e dez meses. Finalmente, a fase de pupa pode durar até 45 dias e, uma vez completada a metamorfose, os adultos chegam a viver aproximadamente 15 dias (Botelho, 2006).



**Figura 3.** Principais fases de desenvolvimento da broca-gigante da cana-de-açúcar (*T. l. licus*). A) Ovos. B) Larva de quinto ínstar. C) Pupa em fase avançada. D) Adulto. Adaptada de Negrisoli *et al.* (2015).

Os ovos da broca-gigante têm forma poliédrica com arestas longitudinais, atingem até 4 mm de comprimento e apresentam coloração verde ou marrom. Os adultos depositam os ovos em touceiras de plantas maduras, no meio de detritos próximos à base do colmo (De Almeida e Arrigoni, 2009). As larvas recém eclodidas apresentam a mesma coloração do ovo e podem medir entre 5 e 6 mm de comprimento. Na primeira fase larval, o inseto ataca a planta perfurando as regiões macias posicionadas na base da planta. Após entrar, as lavas penetram até o interior do rizoma e completam suas fases larvais alimentando-se do colmo da cana. Conforme crescem, as larvas adotam uma coloração branca marfim e podem chegar a medir até 80 mm de comprimento e 12 mm de largura (Pinto *et al.*, 2006).

Na fase de pupa, os indivíduos apresentam coloração castanho escura e medem aproximadamente 40 mm de comprimento. As pupas ficam escondidas no interior de um casulo feito de fibras de cana até o momento do surgimento dos adultos (Pinto *et al.*, 2006). Os adultos têm, aproximadamente, 35 mm de comprimento e 90 mm de envergadura. As mariposas são de coloração escura e, geralmente, apresentam manchas brancas na região apical e uma faixa transversal branca nas asas anteriores (Gallo *et al.*, 2002). O hábito das mariposas é diurno com altos índices de atividade nos períodos mais quentes do dia, diferentemente da maioria de mariposas que apresentam hábitos crepusculares (Moraes e Duarte, 2009). As fêmeas podem depositar entre 50 e 100 ovos (Gallo *et al.*, 2002).

Os danos causados pela broca-gigante são similares aos provocados pela broca da cana. Entretanto, a magnitude dos danos causados pela broca-gigante é significativamente maior, uma vez que as lagartas podem chegar a ser até 8 vezes maiores que as lagartas da broca da cana (Negrisoli *et al.*, 2015). Após a perfuração da cana-de-açúcar, as lagartas alimentam-se dos rizomas, dos restolhos e das raízes, reduzindo seu poder germinativo. Isto enfraquece consideravelmente a planta por meio do secamento do colmo produzindo, muitas vezes, o sintoma de “coração morto”. Assim como a broca da cana, as lagartas da broca-gigante criam túneis e galerias nos rizomas e no colmo facilitando a penetração dos fungos da podridão vermelha causando a inversão da sacarose e diminuindo a produção do açúcar, resultando no tombamento ou na morte das plantas na maior parte dos casos (Figura 4) (Villas Boas, 1986).

Similar à broca da cana, o uso de pesticidas mostra-se ineficaz devido ao hábito endofítico do inseto. Além disso, o ciclo longo da broca-gigante dificulta ainda mais seu controle por pesticidas tradicionais, o que aumenta o número de aplicações do produto, reduzindo a rentabilidade da cultura (Brisceno, 2008). Atualmente, não existe produto químico

registrado no Brasil direcionado para o controle específico da broca-gigante. O controle por catação manual continua sendo a metodologia de controle mais utilizada, embora a baixa eficiência, e a disponibilidade de pessoal técnico para realizar as tarefas de coleta manual, sejam dois problemas nesse tipo de controle que oneram o custo operacional (Pinto *et al.*, 2006).



**Figura 4.** Colmo da cana-de-açúcar brocado por lagartas de quinto ínstar de broca-gigante. A coloração rosa é indiativo para o sintoma da podridão vermelha.

Como alternativa, o controle biológico do inseto não tem sido abordado com muita frequência, embora existam relatos mostrando que a utilização de *B. bassiana* sobre as touceiras recém cortadas diminui as populações de *T. l. licus* em canaviais moderadamente infestados (Negrisoli *et al.*, 2015). Outros possíveis controladores naturais da broca-gigante foram propostos, dentre eles se destacam: o fungo entomopatogênico *Cordyceps exasperata*, nematóides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* e as moscas parasitóides *Palpozenilla palpalis* e *Emdenimyia myersi* (Guagliumi, 1972). Porém, pouco é conhecido sobre a biologia desses insetos e seu potencial no controle da broca-gigante ainda não foi avaliado em campo (Negrisoli *et al.*, 2015).

Da mesma forma que para a broca da cana, a falta de métodos de controle eficientes incentivou aos produtores de cana para investir na geração de plantas de cana modificadas geneticamente. Algumas dessas plantas produzem toxinas Cry relatando atividade inseticida sobre a broca gigante da cana (Craveiro *et al.*, 2010). Além das toxinas Cry, existem diversas ferramentas biotecnológicas que podem ser usadas no controle da broca gigante da cana, dentre as quais destaca-se o silenciamento gênico por RNA interferente (RNAi). Esta tecnologia, diferente das culturas *Bt*, foi caracterizada apenas há duas décadas e seu potencial no controle de insetos-praga vem sendo descrita há menos de dez anos, porém tem despertado grande interesse do setor privado para ser usada no controle de pragas (Zhang, J. *et al.*, 2017).

## 1.6 RNA de interferência como alternativa de controle

A técnica de RNAi consiste na administração de RNA dupla fita (dsRNA) ao inseto (geralmente por microinjeção ou via oral) para silenciar um gene alvo por ativação da rota de *small-interfering* RNA (siRNA). Após a entrada e processamento do dsRNA na célula do inseto ocorre o silenciamento pós-transcricional do gene de interesse, principalmente, por clivagem do RNA mensageiro (mRNA) alvo e posterior degradação deste por nucleases do citoplasma (Rodrigues e Figueira, 2016). Devido a sua alta especificidade e seu baixo efeito em genes não alvo, a tecnologia de RNAi é fortemente promissora no controle de insetos-praga. Nos trabalhos de Baum *et al.* (2007) e Mao *et al.* (2007) confirmaram-se estas afirmações ao gerar plantas transgênicas que utilizam a tecnologia de RNAi no combate a insetos-praga pertencentes as principais ordens de insetos de interesse agrícola, Coleoptera e Lepidoptera. O sucesso da técnica foi validado também em outras ordens de insetos como Hemiptera, Diptera e Orthoptera (Zhu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Xiong *et al.*, 2013; Thakur *et al.*, 2014).

Uma das abordagens para identificar genes alvo com potencial para ser validados por RNAi, é o sequenciamento do genoma e/ou do transcrito (conjunto de genes e/ou transcritos) dos organismos alvo, com a finalidade de gerar bancos de dados contendo genes relacionados com diferentes tipos de processos para a seleção de genes essenciais para a sobrevivência do inseto. Para esse processo, é geralmente necessário o uso das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS: Next generation sequencing), como a técnica de RNA-seq. O uso dessas tecnologias em conjunto com múltiplas ferramentas bioinformáticas de análises de expressão são fundamentais para selecionar corretamente genes alvo (Koch e Kogel, 2014). A análise de transcritomas por meio de RNA-seq permite comparar em nível de expressão a resposta dos insetos estudados frente a condições específicas, ajudando a compreender os diferentes mecanismos moleculares relacionados com a sobrevivência do inseto (Zhang e Yuan, 2013).

Este trabalho apresenta a validação da entrega oral de moléculas de dsRNA, visando o controle da broca da cana e da broca-gigante. Para a seleção de genes alvo foram gerados bancos de dados de sequências de DNA. O trabalho está dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo serão apresentados os resultados do sequenciamento dos transcritomas de intestino médio de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, mostrando a expressão de genes em resposta a diferentes tipos de dieta oferecidas aos insetos. No segundo capítulo será abordada a validação de moléculas de dsRNA específicas contra *D. saccharalis* e *T. l. licus*, discutindo a eficiência da técnica de RNAi nas duas espécies pela entrega oral do dsRNA.

## 2. Justificativa

Os insetos-praga *Diatraea saccharalis* e *Telchin licus licus* são responsáveis por reduzirem significativamente o lucro da indústria canavieira no Brasil. As metodologias de controle atualmente aplicadas, por meio de agentes químicos, trato manual e controle biológico têm se mostrado extremamente onerosas e insuficientes para se evitar os prejuízos causados na lavoura. O manejo dessas duas espécies requer o desenvolvimento de estratégias inovadoras. A produção de plantas transgênicas resistentes a insetos representa uma alternativa muito promissora. Neste contexto, a prospecção e produção de moléculas entomotóxicas para superexpressão em plantas, assim como outras abordagens biotecnológicas, como a supressão funcional de genes por inativação, representam tecnologias com grande potencial para desenvolver culturas resistentes a insetos-praga.

Ativando a via de RNAi é possível reduzir a expressão de genes de forma específica, diminuindo a capacidade reprodutiva de um organismo significativamente. Esta estratégia apresenta grandes vantagens em comparação com os métodos de controle tradicionais. Principalmente, por ser altamente específica, uma vantagem em termos de biossegurança. Além disso, pode diminuir em grande medida o uso de pesticidas sintéticos, contribuindo desta forma com o desenvolvimento de uma economia sustentável. Para desenvolver plantas transgênicas que usem esta tecnologia, é fundamental validar previamente a eficiência das moléculas de dsRNA no organismo alvo. Tal validação exige, entretanto, a escolha de genes alvos que sejam eficazes, mas não apresentem toxicidade contra organismos não alvo. Dessa forma, acrescenta-se que a criação e análise de bancos de dados de sequências de DNA que permitam conhecer a composição gênica dos insetos é uma estratégia atual e reconhecidamente bem-sucedida para auxiliar na identificação dos genes interessantes como alvo para serem silenciadas, interrompendo, dessa forma, vias essenciais para o desenvolvimento normal das populações de insetos-praga.

Este trabalho é de grande importância tanto para a ciência básica, contribuindo com o aumento de conhecimento sobre a biologia molecular da broca da cana e da broca-gigante, quanto para a ciência aplicada, já que permitiu identificar genes que possam ser prospectados como moléculas com potencial efeito entomotóxico nas duas espécies.

### **3. Objetivo Geral**

- Analisar os transcritomas de duas pragas da cana-de-açúcar, broca da cana (*Diatraea saccharalis*) e broca-gigante da cana (*Telchin licus licus*), e validar moléculas de dsRNA com potencial para o uso no controle desses insetos.

#### **3.1 Objetivo capítulo I**

- Analisar os transcritomas de intestino médio de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, obtidos de larvas alimentadas com diferentes dietas.

#### **3.2 Objetivo capítulo II**

- Validar a função do gene que codifica a esterase do hormônio juvenil em *D. saccharalis* e *T. l. licus*, e avaliar seu potencial para controle destes insetos por RNAi.

**Capítulo I - Sequenciamento dos transcritomas de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, e análise da expressão gênica em diferentes dietas.**

## 1. Introdução

### 1.1 Sequenciamento de ácidos nucleicos

No início da década de 1970, foi descrita a primeira metodologia para o sequenciamento de ácidos nucleicos, que permitiu obter o genoma completo do vírus bacteriófago MS2 (Fiers *et al.*, 1976). Mesmo apresentando altos custos operacionais, a nova tecnologia abriu as portas a uma nova era das ciências biológicas, por meio de o desenvolvimento de uma técnica de sequenciamento rápida e eficiente na qual eram adicionados o molde de DNA, oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), DNA polimerase, deoxinucleotídeos (dNTPs) e dideoxinucleotídeos (ddNTPs). Em uma reação de sequenciamento comum, a amostra de DNA era dividida em 4 reações separadas, cada uma contendo um dos ddNTPs e o restante dos componentes mencionados. Após vários *rounds* de extensão, os fragmentos de DNA resultantes eram separados por eletroforese em gel desnaturante de poli-acrilamida, resultando em fragmentos de DNA de diversos tamanhos. Os fragmentos de DNA podiam ser visualizados por autorradiografia ou sob luz UV e então a sequência de DNA podia ser determinada diretamente do filme radiográfico ou da imagem do gel (Saiki *et al.*, 1985).

No decorrer dos anos seguintes, várias inovações tecnológicas permitiram a automatização do sequenciamento. O uso de fluoróforos ligados às moléculas de ddNTPs, cada um emitindo um comprimento de onda específico, possibilitou a utilização dos quatro nucleotídeos em uma mesma reação. O processo de leitura da sequência nucleotídica foi automatizado a partir do desenvolvimento de equipamentos de análise que emitem um feixe de laser sobre o gel, causando a excitação dos nucleotídeos marcados. A fluorescência emitida por cada nucleotídeo passou a ser detectada eletronicamente e convertida digitalmente para um arquivo de sequências. Este método, baseado na técnica de sanger, foi conhecido como sequenciamento de primeira geração (Zhang *et al.*, 2011).

A utilização das tecnologias de sequenciamento nos anos posteriores teve um grande impacto em diversos ramos da ciência, incluindo genômica comparativa, evolução, genética forense, epidemiologia e medicina aplicada. Provavelmente o exemplo mais claro desse impacto foi o sequenciamento do genoma humano (Collins *et al.*, 2003), que surgiu como um dos grandes avanços de século XXI. Além disso, muitos grupos de pesquisa começaram a sequenciar o genoma de diferentes organismos, desde vírus e bactérias até plantas e animais superiores, para responder perguntas biológicas associadas a diversas problemáticas para o ser

humano (Consortium, 2000; Consortium, 2002; Holt *et al.*, 2002; Read *et al.*, 2003). Estes estudos propiciaram o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento com menor demanda de tempo e custo, como o sequenciamento de segunda geração (NGS: *Next generation sequencing*).

## 1.2 Sequenciamento de segunda geração

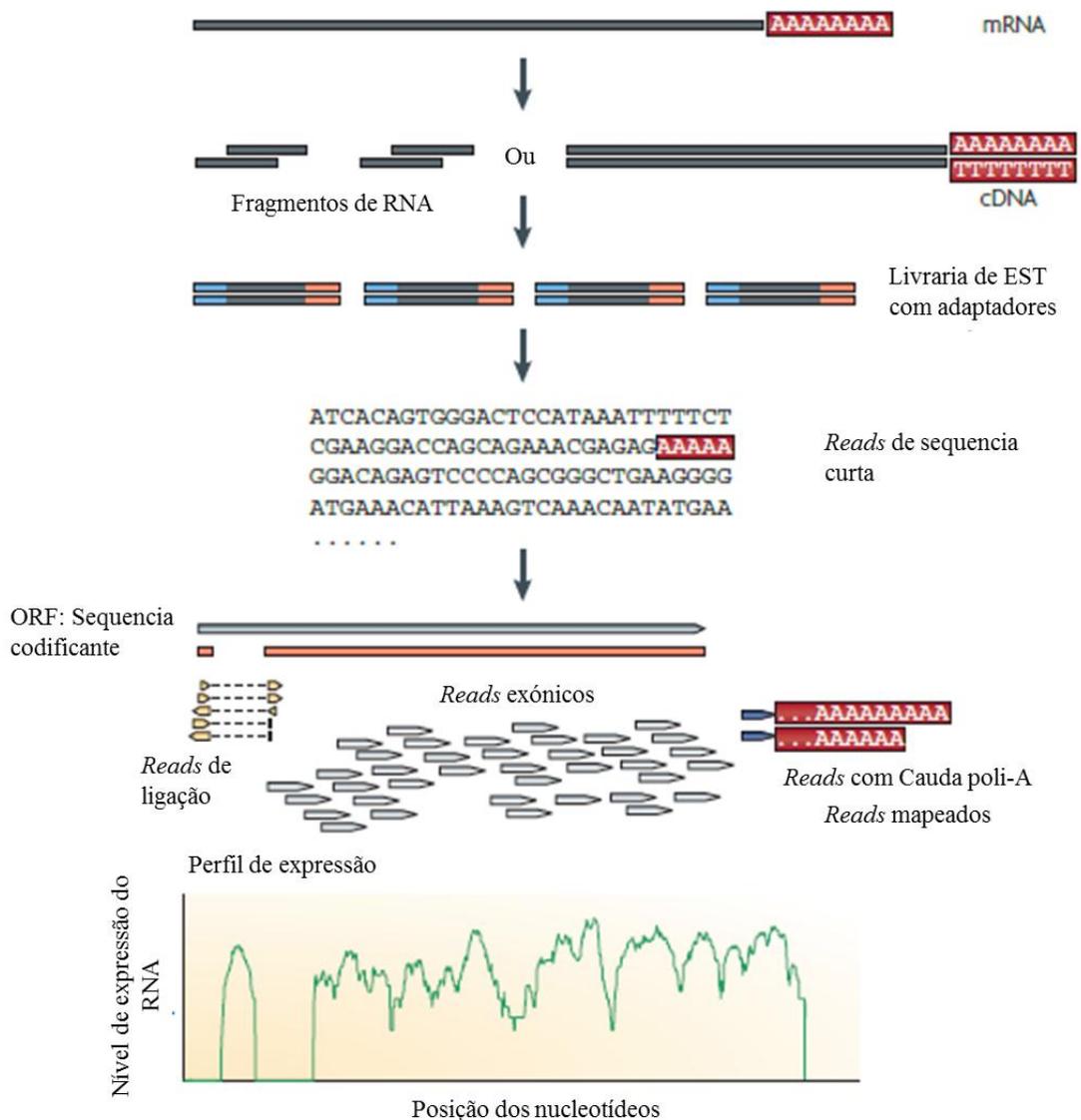
O sequenciamento tipo NGS permite obter a sequência de uma população de DNA com alta acurácia, isto, por meio da fragmentação do DNA, seguida da ligação dos fragmentos gerados a adaptadores para a leitura durante a síntese. As leituras do NGS fornecem sequências de nucleotídeos curtas (*reads*), com tamanhos variando entre 50-500 pares de bases. Esses *reads* são sobrepostos por ferramentas bioinformáticas, seguindo um raciocínio lógico de cobertura onde *reads* com determinado grau de similaridade são agrupados gerando sequências maiores denominadas sequências consenso (*contigs*) (Zhang *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, o NGS se tornou uma ferramenta revolucionária, com uma crescente demanda. Assim, várias tecnologias de NGS têm sido desenvolvidas, permitindo o sequenciamento de DNA em larga escala, destacando-se as plataformas GS-FLX 454 Genome Sequencer (Roche), o Genome Analyser (Illumina), e o ABI SOLiD analyser. Cada uma dessas plataformas tem aplicações diferentes e, portanto, algumas variações relacionadas com tamanho e cobertura dos *reads* obtidos (Fu *et al.*, 2017). A plataforma Illumina possui diferentes variantes com finalidades específicas, dentre elas, o sequenciamento de cDNA, tecnologia conhecida como RNA-seq.

## 1.3 Sequenciamento de RNA

A técnica de RNA-seq permite sequenciar com grande acurácia o cDNA, obtido a partir do mRNA ou RNA total, de praticamente qualquer organismo, sempre que a obtenção de RNA total de alta qualidade seja viável. O transcrito é o conjunto de transcritos (mRNA) presentes em uma célula sob uma determinada situação. A compreensão do transcrito é essencial para interpretar o genoma a partir de uma abordagem funcional, e para comparar diferentes condições, tecidos ou etapas de desenvolvimento. Uma das aplicações da transcriptômica é a quantificação das mudanças de expressão, quando comparando amostras diferentes, em qualquer tipo de situação experimental (Wang, Z. *et al.*, 2009).

Em relação a outras técnicas para quantificar transcritos, como hibridação do RNA, micro-arranjos e sequenciamento tradicional de Sanger, a técnica de RNA-seq possui claras vantagens tanto para mapear quanto para quantificar transcritos (Mortazavi *et al.*, 2008). Os *reads* obtidos no sequenciamento, podem ser posteriormente alinhados com um genoma ou transcriptoma de referência, ou montados usando a metodologia *de novo*, para gerar um mapa de transcrição formado pela estrutura transcricional dos genes e o nível de expressão de cada um deles (Figura 5) (Robertson *et al.*, 2010).



**Figura 5.** Esquema de um típico experimento de RNA-seq. Longas moléculas de RNAs são fragmentadas primeiro a uma biblioteca de sequências curtas de cDNA, por meio de fragmentação do RNA ou do cDNA. Adaptadores de sequenciamento (Azul), são subsequentemente adicionados a cada fragmento de cDNA, obtendo sequências curtas para cada cDNA. Os *reads* resultantes são alinhados com um genoma ou transcriptoma de referência, e classificados em três tipos: reads exônicos, reads de ligação e reads com cauda poli-A. Esses três tipos de reads são usados para gerar um perfil de expressão para cada gene, como representado na parte inferior; uma fase de leitura aberta (ORF: *Open Reading frame*), de uma levedura é mostrado na ilustração. Adaptado de Wang *et al.* (2009).

Existem diferentes programas de bioinformática, desenvolvidos para o processo de montagem de um transcrito, que usam algoritmos otimizados para finalidades específicas (Martin e Wang, 2011). Um dos mais utilizados por sua versatilidade e aplicabilidade, especialmente para montagens *de novo*, é o pacote Trinity (Grabherr *et al.*, 2011). O Trinity está dividido em três componentes: 1) Inchworm, que monta os *reads* sequenciados para gerar uma coleção de *contigs*, assignando um k-mer (variantes associadas a um determinado padrão) a cada *contig*. 2) Chrysalis, que junta os contigs que compartilhem pelo menos um k-mer, e gera grafos de De Bruijn para cada conjunto. 3) Butterfly, que compacta os grafos gerados anteriormente com os *reads* originais, para produzir uma sequência linear final para cada parágrafo ou isoforma.

A técnica de RNA-seq tem um custo menor em relação ao microarranjos, e permite estudar transcritomas sem precisar do uso de genomas de referência. Além disso, possibilita identificar isoformas e entrega informação sobre a conexão entre exões. Esta, dentre outras razões, como o menor custo em relação ao sequenciamento de genomas, possibilitou que os estudos de transcrito em um grande número de organismos tenha se tornado uma ferramenta de grande importância nos últimos anos (Wang, Z. *et al.*, 2009).

#### **1.4 Transcritômica em insetos**

Os insetos possuem uma alta capacidade de adaptação a diversos ambientes e constituem um dos grupos mais diversos de organismos vivos existentes. Além de serem ecologicamente importantes em todos os níveis da cadeia trófica, muitas espécies de insetos geram um impacto direto na vida dos seres humanos, podendo ser prejudiciais ou benéficos (Gullan e Cranston, 2014). No setor agrícola especificamente, insetos prejudiciais são aqueles que atuam como pragas da agricultura, gerando perdas econômicas significativas em diferentes culturas ao redor do mundo.

Os organismos benéficos, por outro lado, são aqueles que ajudam na polinização e proteção das lavouras como, por exemplo, insetos predadores de ovos e larvas, assim como aqueles que proveem materiais de consumo como a seda e o mel (Scudder, 2009). Por causa dessa relação entre insetos e seres humano, a obtenção do genoma de várias espécies de insetos tem se tornado de grande valor para a comunidade científica, permitindo estudos de genômica funcional, análise comparativa, e também análise de parâmetros como, capacidade de transmitir

doenças, comportamento, estudos de evolução, desenvolvimento, dentre outros (Zdobnov e Bork, 2007).

Desde o sequenciamento do genoma de *Drosophila melanogaster*, primeiro genoma de insetos sequenciado (Adams *et al.*, 2000), muitos outros grupos investiram esforços na obtenção dos genomas de diferentes insetos modelo ou de importância para o ser humano, destacando-se dentre eles os genomas de *Tribolium castaneum* (Richards *et al.*, 2008), *Acyrtosiphon pisum* (Richards *et al.*, 2010), *Apis mellifera* (Weinstock *et al.*, 2006), *Bombyx mori* (Consortium, 2008), *Anopheles gambiae* (Holt *et al.*, 2002) e *Aedes aegypti* (Nene *et al.*, 2007). Os avanços produzidos nas tecnologias de sequenciamento, principalmente com a redução de custos, permitiram que muitos outros genomas fossem sequenciados até hoje. A maioria desses genomas pode ser observada em diversas bases de dados públicas como a InsectBase, que contém o genoma de 138 espécies de insetos, assim como transcritomas de 116 espécies (Yin *et al.*, 2016).

Além da genômica, os estudos de transcritômica em insetos têm revelado importantes aspectos sobre a fisiologia, evolução e desenvolvimento de um grande número de insetos. Fazendo uso desta abordagem, foi possível descrever as interações praga-hospedeiro de vários insetos-praga. Desta forma, foi possível entender diversos mecanismos de ação molecular, os quais fornecem informação fundamental para guiar pesquisas visando o controle dessas pragas (Zhang e Yuan, 2013). Muitos desses mecanismos estão relacionados com alimentação e desenvolvimento do inseto na planta hospedeira, defesa do inseto contra mecanismos de proteção da planta hospedeira, reconhecimento de substâncias moduladoras do comportamento, vias de digestão e detoxificação, dentre outros (Firmino *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2014; De Assis Fonseca *et al.*, 2015; Perera *et al.*, 2015; Crava *et al.*, 2016; Wang, Y. *et al.*, 2016). A maioria desses trabalhos utilizaram uma metodologia comparativa, denominada análise de expressão diferencial de genes, para obter informações sobre os mecanismos de ação mencionados.

### **1.5 Análise de expressão diferencial de genes**

O método mais usado para estudar transcritomas é a análise de genes diferencialmente expressos (DEGs: *Differentially expressed genes*), que mostra diferenças de expressão dos transcritos sequenciados entre diferentes condições experimentais (Soneson e Delorenzi, 2013). Uma das limitações mais comuns no momento de analisar dados de transcritômica é a falta de

uniformidade entre as amostras. Essa distribuição não uniforme dos dados deve-se principalmente a duas razões: diferentes coberturas dos *reads* em relação à referência e o tamanho das bibliotecas. A segunda questão, que tem maior impacto em transcritomas montados *de novo*, está no fato de que a contagem de *reads* observada pode não ser diretamente comparável entre amostras. Desta forma, a presença de poucos genes com contagens muito altas (alta expressão), impede uma resolução clara de genes com baixa contagem, causando uma interpretação errada de genes com aparente baixa expressão, depois identificados falsamente como DEGs (Bullard *et al.*, 2010).

Visando desenvolver um método de contagem comparável entre diferentes amostras, têm sido desenvolvidos nos últimos dez anos, esquemas de normalização mais complexos, os quais incluem a estimativa de fatores amostra-específicos para recalcular a representabilidade da amostragem. As metodologias mais robustas desenvolvidas até o momento são a TMM (*trimmed mean of M-values*) e os métodos baseados nas distribuições Binomial Negativa e de Poisson (Anders e Huber, 2010; Robinson e Oshlack, 2010). A segunda metodologia, ao invés de usar a contagem dos *reads* diretamente, gera quantificações transformadas dos dados de RNA-seq como o RPKM (*Reads Per Kilobase per Million mapped reads*) ou o FPKM (*Fragments Per Kilobase per Million mapped reads*), com o objetivo de corrigir as contagens em relação aos diferentes tamanhos das bibliotecas e dos transcritos. Os valores de expressão obtidos a partir de experimentos de RNA-seq podem ser geralmente representados por unidades de RPKM ou FPKM, convertidas em valores de *Fold change* (*Fc*). O *Fc* é definido como a relação que quantifica a variação dos valores de expressão (Garber *et al.*, 2011).

Apesar de ser um campo recente, a análise de expressão diferencial de genes avança rapidamente e novos métodos de otimização são desenvolvidos continuamente. Embora não exista um consenso sobre qual método representa o melhor desempenho para uma situação determinada, existem alguns pacotes de programas informáticos que são frequentemente recomendados para estudos de transcritômica (Soneson e Delorenzi, 2013). Um deles é o pacote edgeR, desenvolvido pelo grupo Bioconductor (Robinson *et al.*, 2010). Na análise de transcritomas de insetos, este tem sido um dos pacotes mais utilizados para analisar estatisticamente expressão diferencial de genes em um determinado experimento, gerando resultados robustos para diferentes tipos de formulações experimentais (Connahs *et al.*, 2016; Ma, J. *et al.*, 2016; Qi *et al.*, 2016; Wang, X. *et al.*, 2016; Gazara *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017).

## 1.6 Estudo da expressão gênica em insetos

A identificação de DEGs para o estudo de transcritomas em insetos tem sido realizada em diferentes situações e condições experimentais. As mais estudadas pelos entomologistas são aquelas relacionadas com diferentes fases de desenvolvimento (Ma, L. *et al.*, 2016; Qi *et al.*, 2016; Sparks *et al.*, 2017), resposta imune (Vogel *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2016), comportamento sexual (Yang *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2016), adaptação a estresse abiótico (Liu *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017), e resposta a diferentes dietas ou fontes de alimentação (Li *et al.*, 2016; Roy, A. W. *et al.*, 2016). Estudos relacionados com este último aspecto têm sido de grande interesse nos últimos anos para análises transcricionais de diversos insetos-praga, devido à possibilidade de obter dados relacionados com a resposta do inseto a diferentes plantas hospedeiras ou dietas, ajudando desta forma a compreender melhor os mecanismos usados pelo inseto para se alimentar da planta. Isto permite identificar genes e rotas metabólicas que podem ser posteriormente exploradas para o controle do inseto (Gog *et al.*, 2014; Herde e Howe, 2014; Spit *et al.*, 2014; Roy, A. *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

A importância de estudar o transcritoma dos insetos-praga em resposta a diferentes hospedeiros ou tipos de dieta é fundamentada na estreita conexão que existe entre o sistema de defesa da planta e o sucesso reprodutivo dos insetos que se alimentam delas (Vogel *et al.*, 2014). As plantas possuem barreiras químicas e mecânicas contra os insetos herbívoros. Dentre as moléculas de defesa das plantas descritas atualmente, se destacam as toxinas aleloquímicas (glicosídeos cianogênicos, ácidos oxálicos, ácidos salicílicos e glucosinolatos), os metabólitos secundários (terpenóides, alcalóides, compostos fenólicos, dentre outros), e os inibidores de proteases (Heckel, 2014). Além disso, os insetos podem desenvolver adaptações comportamentais, moleculares e fisiológicas para superar essas barreiras e garantir o seu crescimento, desenvolvimento e reprodução. Tais adaptações estão fortemente ligadas a mudanças de expressão em genes ou grupos de genes específicos (Hendry *et al.*, 2013).

Os mecanismos moleculares por meio dos quais os insetos conseguem superar as barreiras químicas da planta são pouco conhecidos. Porém, o sequenciamento massivo de transcritomas de insetos realizados nos últimos anos tem permitido identificar um grande número de genes relacionados com detoxificação, reconhecimento sensorial de sequências voláteis, e resistência contra metabólitos secundários (Vogel *et al.*, 2014). Genes que codificam proteínas de diferentes famílias, envolvidas em processo de detoxificação, foram caracterizados em várias espécies de insetos. Algumas das famílias proteicas melhor descritas são: citocromo

P450 (P450), glutationas S-transferases (GSTs), Glucuronosiltransferases (UGTs), carboxilesterases (CEs) e os transportadores do tipo ABC (Heckel, 2014).

Um grande número de genes que codificam estas proteínas, apresenta uma expressão significativamente maior no intestino, em relação a outros tecidos do inseto. Isto deve-se ao fato de que o sistema digestivo é a primeira linha de defesa do inseto, além de ser o principal tecido onde ocorre o processo de absorção de moléculas vindas do meio externo (Tellam, 1996). A obtenção do perfil de expressão de genes no intestino de diferentes insetos-praga, submetidos a diferentes hospedeiros ou dietas, é de grande importância para entender o papel das diferentes proteínas envolvidas na defesa do inseto, frente às barreiras químicas da planta.

## **2. Objetivo geral**

- Analisar os transcritomas de intestino médio de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, obtidos de larvas alimentadas com diferentes dietas.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Sequenciar RNA de *D. saccharalis* e *T. l. licus* e gerar um banco de dados para cada espécie contendo sequências de transcritos.

- Estudar a expressão diferencial de genes observada em *D. saccharalis* e *T. l. licus* em resposta a diferentes dietas.

- Identificar genes pertencentes a rotas metabólicas essenciais para a sobrevivência de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, com potencial uso no controle por RNAi.

### 3. Material e métodos

#### 3.1 Obtenção dos insetos e extração de RNA

Larvas de 4 e 5 ínstar de *D. saccharalis* e *T. l. licus* foram obtidas de colmos de cana-de-açúcar infestados, de canaviais situados no estado de Alagoas. Com a finalidade de gerar um banco de dados de sequências para os dois insetos e avaliar a expressão de genes do intestino, em resposta ao tipo alimentação, foram realizados três tratamentos: lagartas em jejum, alimentadas com colmo de cana-de-açúcar, e alimentadas com dieta artificial (Anexo I) adaptada das dietas avaliadas por Wadt (2012) e Vacari *et al.* (2012). As lagartas foram mantidas em placas TPP de fundo chato (Teratec) a  $28 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa e fotoperíodo de 12/12 h (C:E).

Para todos os tratamentos, as lagartas foram submetidas a condição de jejum durante 24 horas, com a finalidade de eliminar totalmente restos de alimento do intestino, presentes devido a períodos de alimentação prévios com colmo de cana. Foram utilizadas para cada tratamento tres larvas de quarto instar e tres larvas de quinto instar, e cada experimento foi conduzido em duplicata. Após 72 h de tratamento, as larvas foram coletadas e submetidas à dissecação do intestino. Após os intestinos serem congelados e macerados em nitrogênio líquido, o RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), conforme instruções do fabricante. O RNA total foi tratado com DNAase I (Invitrogen, EUA) na relação de 1U por cada 1 µg de RNA. A qualidade e integridade dos RNAs foram avaliadas utilizando o equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Após confirmar a qualidade das amostras, estas foram quantificadas utilizando o fluorímetro Qubit 2.0 (Life Technologies). Pelo menos 10 µg de cada RNA foram preservados em RNA Stable Kit (Sigma Aldrich) e enviados para sequenciamento pela plataforma Illumina HiSeq2500, na empresa Roy J. Carver Biotechnology Center (University of Illinois). O RNA foi sequenciado em ambos os sentidos (*paired-end*) gerando reads entre 100 e 150 nucleotídeos. Para facilitar a montagem das sequências, para cada inseto foi gerada também uma biblioteca de cDNA referência, a partir de um *pool* contendo uma alíquota de cada amostra de RNA em quantidades equimolares das diferentes condições fisiológicas (tratamentos).

## 3.2 Análise dos transcritomas

### 3.2.1 Pré-processamento das sequências

Após receber os dados brutos do sequenciamento (*reads* totais) em formato fastq, a qualidade das *reads* foi analisada usando a ferramenta FastQC versão 0.11.5, que permite diagnosticar qualquer problema relacionado com a construção das bibliotecas, ou mesmo na etapa de sequenciamento (Andrews *et al.*, 2016). Foi realizada a verificação da quantidade total de sequências e feito o diagnóstico sobre: qualidade das bases, porcentagem de GC, comprimento das sequências, e sequências duplicadas ou super-expressas. Após estas verificações, os *reads* foram trimados usando o programa Trimmomatic versão 0.33, com o objetivo de eliminar sequências de baixa qualidade (Phred < 35) e adaptadores do sistema Illumina (Bolger *et al.*, 2014).

Como etapa final do pré-processamento, as bibliotecas foram normalizadas usando o programa KHMER versão 2.0, que permite reduzir os custos computacionais, aumentando a cobertura dos *reads* e diminuindo o tamanho do conjunto de dados (Crusoe *et al.*, 2015). Desse modo, os *reads* remanescentes desse processo de limpeza foram utilizados posteriormente para o processo de montagem.

### 3.2.2 Montagem e anotação

Os *reads* foram montados *de novo* utilizando o programa Trinity, utilizando os parâmetros padrão do programa (Haas *et al.*, 2013). A montagem foi feita concatenando todas as bibliotecas previamente processadas, gerando um único arquivo em formatação fasta (.fa), contendo todas as sequências consenso (*contigs*). Cada agrupamento desses *contigs* em função da similaridade dos fragmentos de cDNA (EST: *expressed sequence tag*), foi designado como unigenes (*contigs* únicos).

Após a montagem, foi realizada uma busca por homologia (BLASTx e BLASTn. *E-value* mínimo:  $1 \times 10^{-5}$ ) usando o banco de dados não redundante (nr) do NCBI, para identificar ORFs preditas nas sequências montadas. Tanto as sequências que não apresentaram nenhuma sequência homóloga reportada no banco de dados nr quanto as que unicamente apresentaram homologia com microrganismos ou plantas, foram retiradas da montagem, com a finalidade obter uma análise de expressão diferencial mais acurada.

A anotação funcional foi realizada usando o programa Blast2GO v4.3 Basic (Conesa *et al.*, 2005), por meio de classificação por termos de ontologia gênica (GO; [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)) e códigos de classificação enzimática (E.C). Para isso foram utilizadas, a base de dados de proteínas do InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>), e a base de dados de vias metabólicas KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <http://www.genome.jp/kegg/>). Adicionalmente, foi utilizado o programa BUSCO v3 com a finalidade de avaliar a qualidade dos transcritomas sequenciados (Simão *et al.*, 2015).

### 3.2.3 Análise de expressão diferencial

A análise para identificar genes diferencialmente expressos nas entre os tratamentos propostos foi realizada seguindo o pipeline do Trinity versão 2.0.6 (Grabherr *et al.*, 2011). Para o mapeamento das diferentes bibliotecas foi usado o pacote RSEM (Li e Dewey, 2011) e o pacote edgeR para análise estatística da expressão diferencial de genes (Robinson *et al.*, 2010). A expressão foi analisada usando todas as isoformas dos transcritos, e os parâmetros usados para executar o edgeR foram: Valor  $P < 0,01$  e *Fold change*  $\geq 2$ . Inicialmente a análise foi feita usando como referência, as bibliotecas do tratamento “jejum”, porém, por causa da alta variação entre as duplicatas destas bibliotecas, a análise foi realizada novamente retirando as bibliotecas mencionadas, e usando como nova referência, as bibliotecas da condição “dieta artificial”.

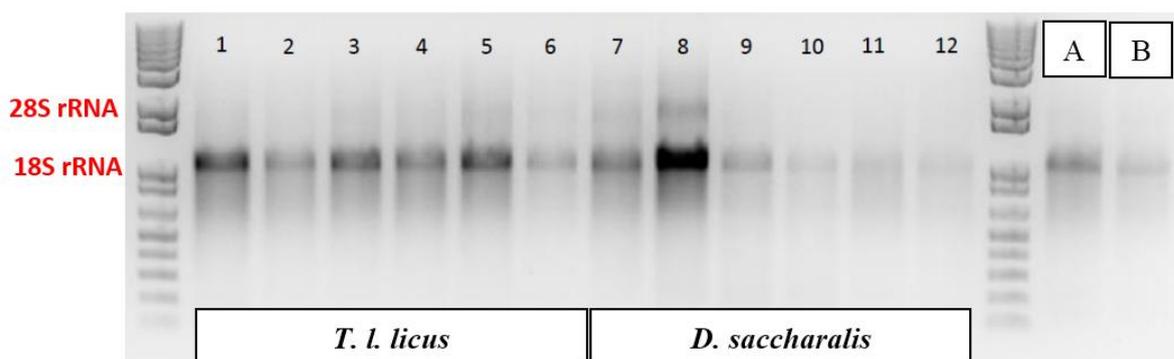
### 3.2.4 Enriquecimento de termos GO

A análise de enriquecimento de termos GO (*GO Enrichment analysis*), foi realizada para identificar quais termos de ontologia gênica estavam estatisticamente enriquecidos no conjunto de genes diferencialmente expressos. Para esta análise foi utilizado o pacote FUNC, seguindo os parâmetros padrão do programa (Prüfer *et al.*, 2007). Os termos enriquecidos foram filtrados posteriormente, com a finalidade de eliminar redundâncias que pudessem levar a interpretações erradas dos dados. O processo de filtragem foi realizado usando a ferramenta REVIGO (Supek *et al.*, 2011), com uma similaridade permitida de 0,5. Os *Heatmaps* representado a expressão dos DEGs foram gerados usando o programa ClustVis (Metsalu e Vilo, 2015). A escala de expressão, foi determinada pelos valores de FPKM normalizados pelo edgeR.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Extração de RNA total

As amostras de RNA total extraído de *T. l. licus* e *D. saccharalis*, em diferentes condições de alimentação, apresentaram a qualidade e integridade requeridas para a plataforma de sequenciamento Illumina. Isto foi confirmado por eletroforese em gel de agarose (Figura 6), por meio da qual foi observado um rastro de RNA total com bandas correspondentes aos RNAs das subunidades ribossomais 28S e 18S, de acordo com o perfil padrão de RNA total de insetos (Winnebeck *et al.*, 2010). Em adição, a ausência de bandas com tamanhos inespecíficos indica que não houve degradação suficiente do RNA total, para reduzir a qualidade do mesmo abaixo do mínimo requerido para sequenciamento.



**Figura 6.** RNA total extraído de *T. l. licus* e *D. saccharalis*, visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%. As condições de alimentação correspondem a: 1) Cana-de-açúcar replica I, 2) Cana-de-açúcar replica II, 3) Dieta artificial replica I, 4) Dieta artificial replica II, 5) Jejum replica I, 6) Jejum replica II, 7) Cana-de-açúcar replica I, 8) Cana-de-açúcar replica II, 9) Dieta artificial replica I, 10) Dieta artificial replica II, 11) Jejum replica I, 12) Jejum replica II. A) Biblioteca de referência de *T. l. licus*, B) Biblioteca de referência de *D. saccharalis*. O marcador de DNA utilizado foi o 1Kb plus Ladder (Invitrogen).

### 4.2 Análise dos transcritomas

#### 4.2.1 Pré-processamento

O número total de *reads* pareados (*paired reads*), obtidos a partir do sequenciamento do intestino de *T. l. licus* oscilou entre 12.322.293 para a menor biblioteca e 26.067.335 para a maior. No caso do sequenciamento para *D. saccharalis*, os valores oscilaram entre 11.627.392 para a menor biblioteca e 23.107.200 para a maior. As bibliotecas de referência, como era de se esperar, apresentaram uma quantidade consideravelmente maior de *reads* (48.016.674 para *D. saccharalis* e 57.057.629 para *T. l. licus*). A média do número total de *reads* entre as seis bibliotecas (excluindo as referências) foi de  $18,0 \times 10^6$  para *D. saccharalis* e  $18,3 \times 10^6$  para *T. l.*

*licus*. O número inicial de *reads* e o número de *reads* após cada fase do pré-processamento, estão descritos para cada biblioteca na tabela 1.

**Tabela 1.** Número total de reads pareados em cada fase do pré-processamento das oito bibliotecas obtidas por sequenciamento Illumina Hi-seq2500, para *T. l. licus* e *D. saccharalis*.

Biblioteca de cDNA	Reads iniciais (x10 <sup>6</sup> )		Reads após Trimagem (x10 <sup>6</sup> )		Reads após Normalização (x10 <sup>5</sup> )	
	<i>D. saccharalis</i>	<i>T. l. licus</i>	<i>D. saccharalis</i>	<i>T. l. licus</i>	<i>D. saccharalis</i>	<i>T. l. licus</i>
Referência	48,0	57,6	35,5	42,5	74,9	91,0
Dieta artificial I	11,6	14,8	11,3	14,2	35,9	55,5
Dieta artificial II	14,5	21,0	14,0	20,2	39,1	73,9
Jejum I	19,6	14,1	18,9	13,5	62,5	64,8
Jejum II	17,5	21,9	16,9	21,1	47,8	84,4
Cana-de-açúcar I	21,9	12,3	21,2	11,8	73,4	52,1
Cana-de-açúcar II	23,1	26,1	22,3	25,0	89,8	85,1

Em relação à média do número de *reads* totais, alguns transcritomas recentemente sequenciados, a partir do intestino de outros insetos, apresentaram resultados similares aos observados neste trabalho (Herde e Howe, 2014; Wu *et al.*, 2016; Gazara *et al.*, 2017). Embora isso possa variar, dependendo do tamanho dos *reads* permitido pela plataforma de Illumina utilizada, como no caso do trabalho de Roy, A.W. *et al.* (2016), que obtiveram até quatro vezes mais *reads* a partir do intestino médio de três espécies de *Spodoptera spp.* submetidas a condições similares as do nosso experimento. Após o pré-processamento, apenas o 29,3% e 35,4% dos *reads* sequenciados para *D. saccharalis* e *T. l. licus* respectivamente foram utilizados para a montagem *de novo*, devido a que esta porcentagem incluem os *reads* apresentando a qualidade mínima requerida e eliminando redundâncias após a normalização.

#### 4.2.2 Montagem *de novo* e anotação funcional

A montagem *de novo* utilizando o programa Trinity, gerou um total de 121.538 *contigs* para *T. l. licus*, dos quais 51.933 foram *contigs* únicos. Os *contigs* restantes fazem parte das isoformas geradas pelo montador. Da mesma forma, foram gerados 115.346 *contigs* para *D. saccharalis*, dos quais 40.974 foram *contigs* únicos. A montagem final foi obtida após a busca por homologia nas bases de dados nr do NCBI e a anotação de termos GO (Tabela 2). O número total de transcritos da montagem final foi: 49.225 (18.582 *contigs* únicos) para *D. saccharalis* e 53.108 (20.137 *contigs* únicos) para *T. l. licus*.

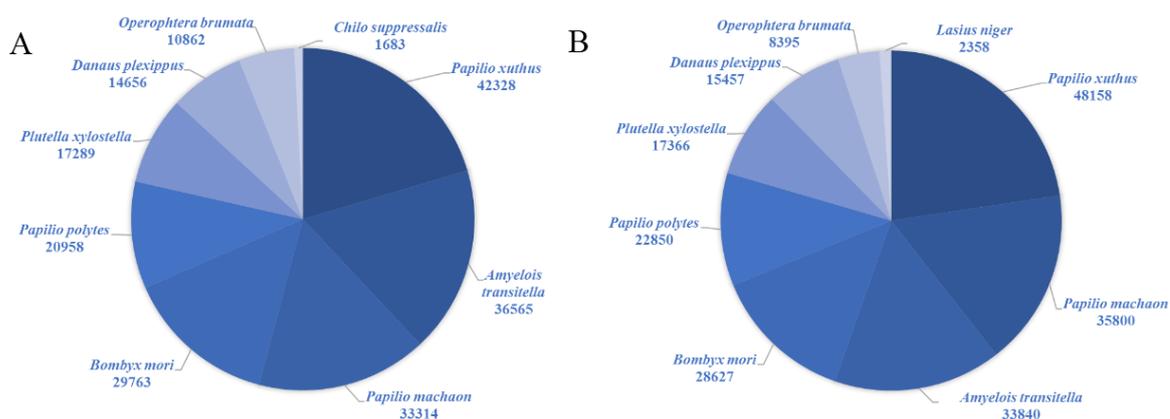
**Tabela 2.** Número total de transcritos montados a partir das 8 bibliotecas de cDNA, sequenciadas a partir do intestino de *T. l. licus* e *D. saccharalis*.

Etapa de análise	Número de Sequências	
	<i>D. saccharalis</i>	<i>T. l. licus</i>
<i>Contigs</i> da montagem inicial	115.346	121.538
<i>Contigs</i> com pelo menos uma sequência homóloga reportada na base de dados nr do NCBI	50.206	54.162
<i>Contigs</i> sem sequências homólogas reportadas na base de dados nr do NCBI	65.140	67.376
<i>Contigs</i> contaminantes	981	1.054
<i>Contigs</i> com pelo menos um termo GO associado	20.384	20.785
<i>Contigs</i> sem termos GO associados	28.841	32.323
<i>Contigs</i> da montagem final	49.225	53.108

A porcentagem de sequências que tiveram pelo menos uma sequência homóloga reportada no banco de dados do NCBI foi 43,5% para *D. saccharalis* e 44,5% para *T. l. licus*. Portanto, pouco mais da metade das sequências montadas inicialmente para os dois insetos, podem corresponder a sequências de RNA ribossomal (rRNA), RNA não-codificante (ncRNA: non-coding RNA), ou RNA codificante para proteínas não conhecidas ou não reportadas nas bases de dados do NCBI. Estas sequências foram retiradas da montagem, visando realizar de forma mais precisa a análise de expressão diferencial.

Porém, é importante destacar que essas sequências retiradas, geralmente denominadas “sequências lixo”, as quais formam mais do 50% dos transcriptomas sequenciados neste trabalho, podem conter informação de grande relevância para outro tipo de estudos. Por exemplo, estudos que permitam entender os mecanismos de regulação gênica. Para aproveitar essa e outro tipo de informações geradas por RNA-seq, é necessário o desenvolvimento de ferramentas bioinformáticas que permita interpretações biológicas mais precisas (Knowling e Morris, 2011; Granata *et al.*, 2017).

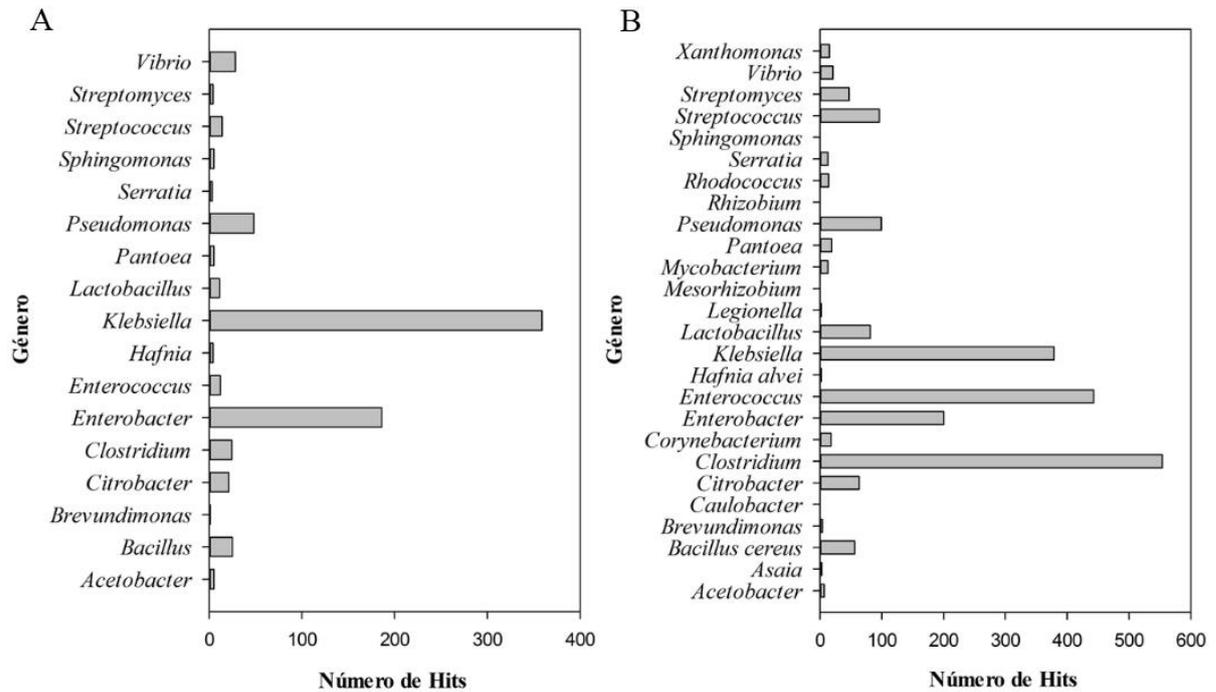
O resultado do blast mostrando as nove espécies com maior número de *hits* para ambos transcriptomas (Figura 7) permite observar nos dois casos, que todas as espécies são da ordem Lepidoptera. Por outro lado, nem *D. saccharalis* nem *T. l. licus* apareceram entre as espécies com maior número de *hits*, mostrando assim, a escassa disponibilidade de sequências para essas duas espécies no banco de dados do NCBI. Isto confirma a importância e novidade de gerar um banco de sequências para estes insetos.



**Figura 7.** Resultados da busca por homologia (Blast), mostrando as espécies com maior número de hits correspondentes às sequências obtidas a partir dos transcritomas de: A) *D. saccharalis* e B) *T. l. licus*.

Dentre as sequências que foram selecionadas após a análise do Blast, apenas o 1,95% para *D. saccharalis* e o 1,94% para *T. l. licus* foram retiradas como contaminantes. Essa etapa é importante devido a que até o momento não está disponível o genoma dessas duas espécies. Isto dificulta a detecção de sequências exógenas ao genoma dos organismos estudados. Para montagens feitas *de novo*, a presença de sequências contaminantes considera-se uma das principais fontes de ruído, podendo levar a interpretações erradas no momento de analisar genes diferencialmente expressos (Strong *et al.*, 2014; Conesa *et al.*, 2016). No presente estudo, a baixa porcentagem de sequências contaminantes é um indicador da boa qualidade do sequenciamento, para os dois transcritomas obtidos. Porém, uma parte dessas sequências pode fazer parte do microbioma do intestino de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, como foi descrito previamente em outros lepidópteros (Mason e Raffa, 2014; Xia *et al.*, 2017). Dentre os gêneros de microrganismos com sequências homólogas nos transcritomas de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, aqueles que foram reportados no microbioma de outros lepidópteros estão descritos com seu respectivo número de *hits* na figura 8.

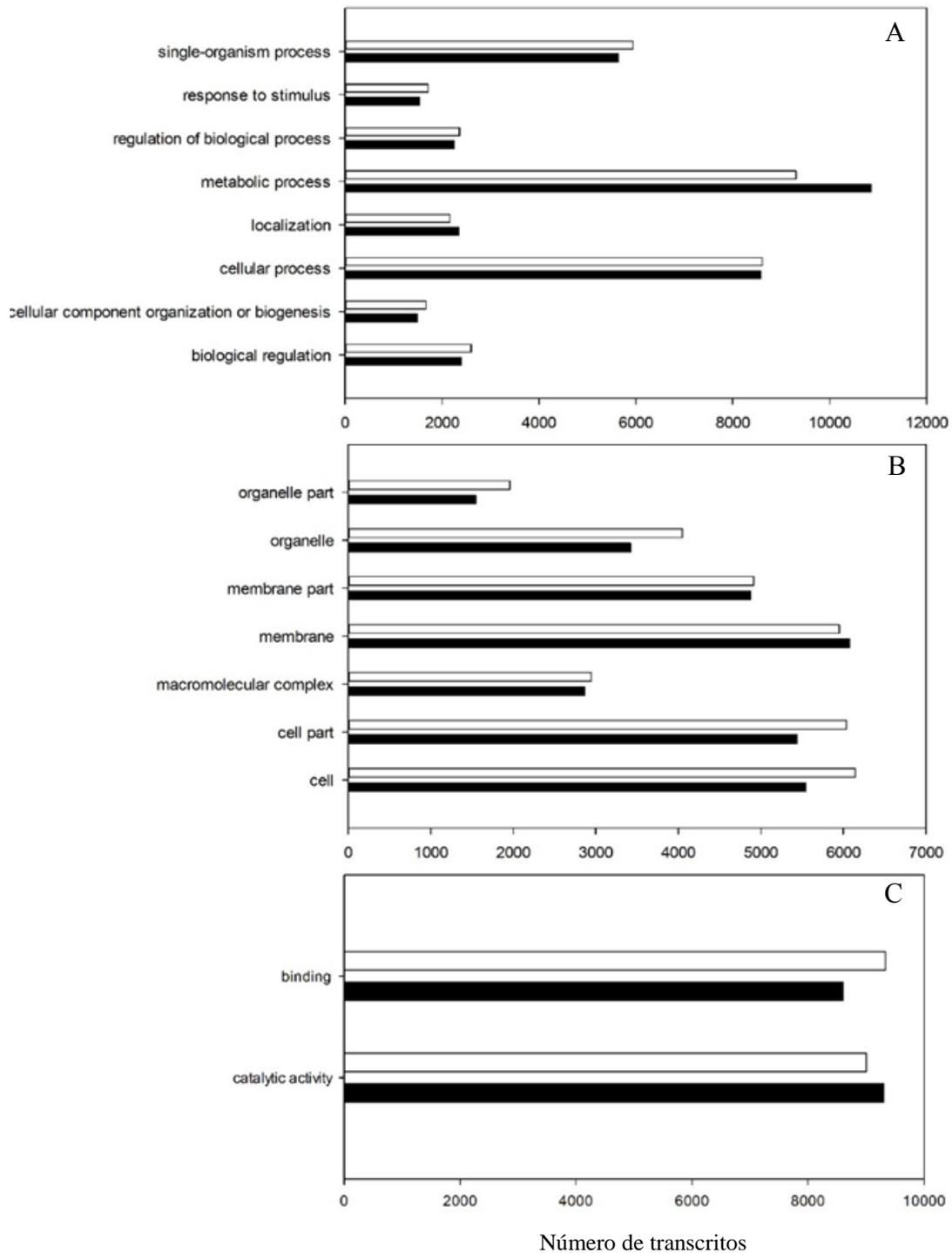
O resultado do BLAST permitiu identificar *hits* de 17 e 26 gêneros de microrganismos diferentes, nos transcritomas de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, respectivamente. O gênero *Klebsiella* apresentou o maior número de *hits* no transcritoma da broca da cana, enquanto que o gênero *Clostridium* apresentou o equivalente na broca-gigante. Outros gêneros abundantes foram: *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Enterococcus*. Algumas espécies pertencentes aos gêneros mencionados, entre outros, foram descritos no microbioma de outros insetos como mediadores no desenvolvimento de adaptações relacionadas com herbivoria e resistência a inseticidas (Xia *et al.*, 2013; Staudacher *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2017).



**Figura 8.** Resultados da busca por homologia (Blast), mostrando o número de hits correspondente a gêneros de microrganismos previamente reportados como parte da microbiota de outros lepidópteros. A) *D. saccharalis*. B) *T. l. licus*.

O estudo do microbioma associado ao intestino dos insetos é uma área de grande interesse biotecnológico. Dados obtidos a partir de RNA-seq são considerados como informação valiosa para abordar o estudo do microbioma (Krishnan *et al.*, 2014). Não obstante, devido as condições experimentais usadas neste estudo, não é possível esclarecer quais organismos derivam-se da microbiota do intestino ou de contaminação exógena. Para confirmar a presença destes organismos no microbioma do intestino de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, são necessários outros tipos de estudos, envolvendo particularmente sequenciamento dos rRNAs.

Após a filtragem de sequências contaminantes, foi realizada a anotação funcional por ontologia gênica, que também apresentou resultados similares entre os dois transcritomas. Apesar da baixa porcentagem de transcritos anotados com pelo menos um termo GO (41,4% para *D. saccharalis* e 39.1% para *T. l. licus*), foi possível observar resultados concordantes entre ambas anotações, no nível mais alto das três categorias principais de ontologia gênica: processos biológicos, componente celular e função molecular (Figura 9).



**Figura 9.** Resultados da anotação funcional de genes por ontologia gênica (GO), mostrando o número de sequências anotadas com os termos de nível II pertencentes às três categorias principais de GO: A) Processos biológicos B) Componente celular e C) Função molecular. As barras pretas correspondem a *D. saccharalis* e as barras brancas a *T. l. licus*.

Interessantemente, a ausência de termos de nível alto anotados em baixa quantidade para um dos transcriptomas em comparação com o outro é importante para realizar uma análise comparativa de enriquecimento de termos GO no conjunto de genes diferencialmente expressos. Isto deve-se a que os algoritmos usados para calcular a significância estatística dos

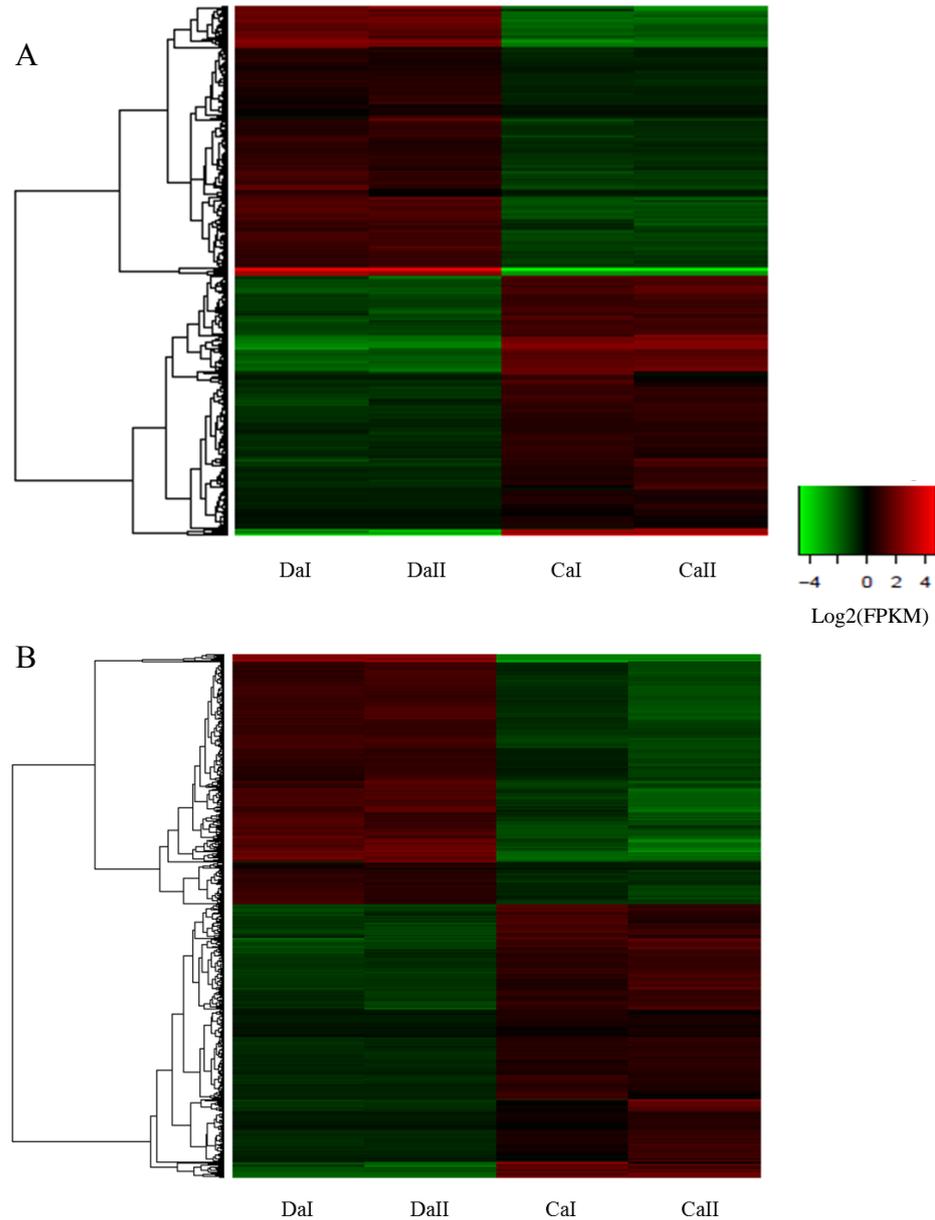
termos enriquecidos, em um conjunto de genes, são diretamente relacionados com o número de vezes que um termo é anotado no transcrito analisado (Rivals *et al.*, 2006). Portanto, quando comparando dois transcritomas diferentes, obtidos a partir das mesmas condições, o ajuste feito para calcular a significância estatística terá uma variância menor no conjunto de DEGs, quando o número de vezes que um termo é anotado em cada transcrito seja similar. Desta forma torna-se possível concluir que as diferenças ou similaridades, de termos enriquecidos, observadas entre os conjuntos de DEGs dos dois transcritomas, sejam consequência de uma resposta transcricional diferenciada e não devido a discrepâncias da anotação funcional.

Outro resultado que confirma a similaridade entre as duas anotações é o fornecido pelas métricas do BUSCO. Foi utilizado um conjunto de 1.066 BUSCO's, os quais são grupos de genes constitutivos, cuja frequência ao longo da história evolutiva dos organismos foi testada usando modelos matemáticos, para serem usados como indicadores da completude de um determinado genoma ou transcrito (Granata *et al.*, 2017). A completude dos transcritomas do intestino de *D. saccharalis* e *T. l. licus* foi de 97% e 98% respectivamente.

#### 4.2.3 Expressão diferencial de genes

Os *reads* não normalizados de todas as bibliotecas (excluindo bibliotecas de referência) foram mapeados usando o pacote RSEM do Trinity e foi obtida uma porcentagem de mapeamento média de 74,2%  $\pm$ 3,3 e 75,2%  $\pm$ 1,9 para *D. saccharalis* e *T. l. licus*, respectivamente. Obter porcentagens similares de *reads* mapeados, é um dos requerimentos principais para comparar os resultados de expressão diferencial entre os dois transcritomas. Para a análise de expressão diferencialmente foram obtidos 2780 DEGs para *D. saccharalis* e 3664 DEGs para *T. l. licus*, usando como referência a condição de jejum. Porém, a condição de jejum foi retirada da análise após verificar a qualidade das réplicas biológicas. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) entre as réplicas de cada tratamento, foi calculado usando os valores de FPKM transformados em escala logarítmica com base 2. Os valores observados de  $R^2$  das réplicas na condição de jejum apresentaram-se abaixo do limite estabelecido neste trabalho para realizar a análise estatística do edgeR ( $R^2 \geq 0.75$ ). A análise de expressão diferencial depende fundamentalmente da qualidade e quantidade das réplicas biológicas, as quais devem apresentar a menor variabilidade possível. Desta forma, no presente trabalho, a perda de informação tem um menor impacto na interpretação que o uso de dados com alta variabilidade que podem levar a interpretações erradas dos dados.

Após realizar novamente a análise de expressão diferencial, usando a dieta artificial como condição de referência, foram obtidos 1872 DEGs para *D. saccharalis* e 2465 DEGs para *T. l. licus*. Na figura 10 podem se observar os mapas de calor, representando a distribuição dos valores de Log<sub>2</sub>(FPKM) dos transcritos diferencialmente expressos. De forma semelhante para os dois transcriptomas, foram gerados dois grupos principais de DEGs seguindo o método padrão de agrupamento do edgeR.



**Figura 10.** Mapas de calor mostrando os níveis de expressão normalizados dos DEGs obtidos a partir da análise de expressão diferencial dos transcriptomas de intestino de: A) *D. saccharalis* B) *T. l. licus*. A escala mostrando os valores de Log<sub>2</sub>(FPKM), representa os níveis de expressão desde o menor (-4) até o maior (4). DaI: Dieta artificial replica I. DaII: Dieta artificial replica II. CaI: Cana-de-açúcar replica I. CaII: Cana-de-açúcar replica II.

No caso do transcriptoma de *D. saccharalis* foi observado um conjunto de 978 genes super-expressos no intestino do inseto alimentado com cana-de-açúcar, em relação ao alimentado com dieta artificial. Por outro lado, 894 genes foram observados super-expressos no intestino do inseto alimentado com dieta artificial. A mesma análise realizada em *T. l. licus* gerou dois conjuntos de DEGs semelhantes, um grupo formado por 1211 genes super-expressos no intestino dos insetos alimentados com cana-de-açúcar, e outro grupo com 1254 genes super-expressos no intestino dos insetos alimentados com dieta artificial. No presente estudo foram observados 3,8% e 4,6% de *contigs* diferencialmente expressos, para *D. saccharalis* e *T. l. licus*, respectivamente. A porcentagem DEGs permite entender o panorama geral da resposta do organismo frente a uma situação determinada. Uma alta porcentagem de DEGs pode indicar uma resposta muito generalizada e conseqüentemente mais difícil de interpretar. Por outro lado, uma menor porcentagem de DEGs reflete uma resposta especializada e específica para determinadas vias metabólicas, como observado nos trabalhos realizados por Wu *et al.* (2016) com o Bicho-pau (*Clitarchus hookeri*) e Herde e Howe (2014) com a Lagarta plusia (*Trichoplusia ni*), que reportaram 1,2% e 8,7% de DEGs respectivamente. Um estudo mais recente mostrou porcentagens entre 9% e 14% de unigenes diferencialmente expressos, analisando de forma independente o transcriptoma de quatro insetos diferentes (Gazara *et al.*, 2017).

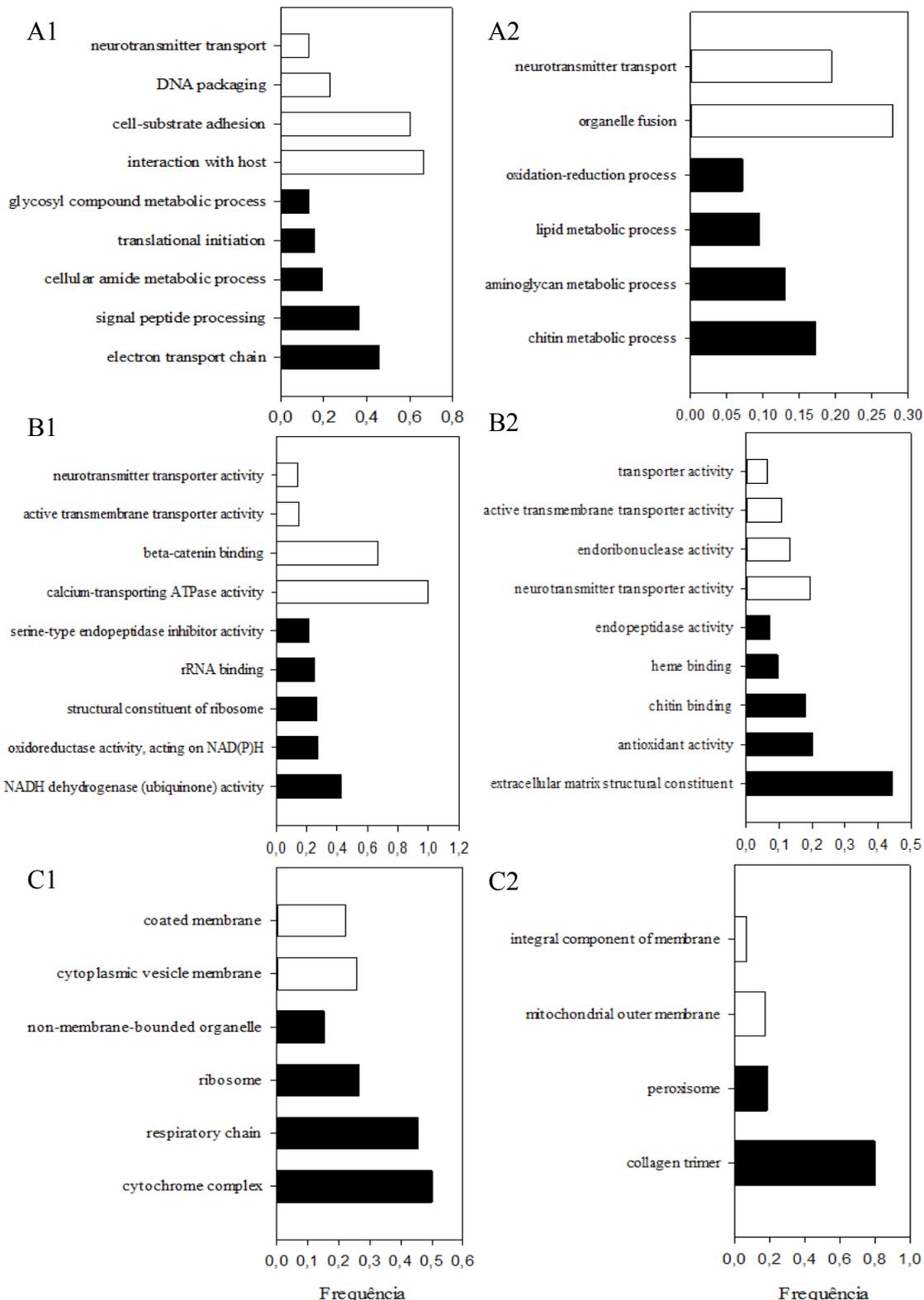
#### 4.2.4 Análise de enriquecimento por ontologia gênica

O enriquecimento de termos GO permitiu categorizar os DEGs em dois conjuntos de expressão (genes super-expressos e genes sub-expressos), ambos na condição do inseto alimentado com cana-de-açúcar, em referência aos alimentados com dieta artificial (Tabela 3).

**Tabela 3.** Número total de termos GO associados aos DEGs, observados nos transcriptomas de intestino de *T. l. licus* e *D. saccharalis*.

Conjunto de genes / Termos GO associados	Número de termos GO iniciais		Número de termos GO após filtragem	
	<i>D. saccharalis</i>	<i>T. l. licus</i>	<i>D. saccharalis</i>	<i>T. l. licus</i>
Genes super-expressos	97	34	16	15
Genes sub-expressos	186	29	26	10

Finalmente, os termos GO mais enriquecidos em cada conjunto de DEGs foram estudados separadamente (Figura 11). O grau de enriquecimento foi definido pela proporção entre a frequência observada do termo no conjunto de DEGs e a frequência esperada do termo, proveniente da anotação global do transcriptoma.



**Figura 11.** Termos GO mais enriquecidos para cada conjunto de genes diferencialmente expressos nos transcritomas de *D. saccharalis* e *T. l. licus*. Estão representados os termos não redundantes, com maior frequência de enriquecimento observada nos conjuntos de DEGs obtidos a partir da análise do FUNC. 1) *D. saccharalis*. 2) *T. l. licus*. A figura mostra de forma independente, os termos das três categorias principais de ontologia gênica: A) Processos biológicos, B) Função molecular e C) Componente celular. As barras pretas representam o conjunto de genes super-expressos na condição de alimentação com cana-de-açúcar e as barras brancas o conjunto de genes super-expressos na condição de alimentação com dieta artificial.

Apenas termos relacionados com transporte de moléculas (transporte de neurotransmissores e transporte ativo transmembranar) e degradação de proteínas (atividade endopeptidase), foram enriquecidos nas duas análises. Genes relacionados com transporte de moléculas foram super-expressos nos insetos alimentados com cana de açúcar, entretanto genes associados a degradação de proteínas apresentaram-se sub-expressos. Por outro lado, é possível observar, com base nas diferenças dos resultados de enriquecimento para os dois insetos, particularidades relacionadas ao tipo de rotas metabólicas induzidas ou suprimidas em cada inseto, como resposta à fonte de alimentação.

A broca da cana alimentada com cana-de-açúcar, por um lado, induz a ativação de genes pertencentes a vias relacionadas com sinalização celular e transdução (ligação com beta-cateninas, transporte de cálcio transmembranar e produção de vesículas), entretanto genes relacionados com produção de energia por meio da cadeia respiratória (transporte de elétrons, complexo do citocromo c e atividade ubiquinona) e genes reguladores da tradução (iniciação da tradução, ligação com rRNA e constituintes do ribossomo), são sub-expressos na condição mencionada. Por outro lado, a broca-gigante induz principalmente a ativação de vias de transporte de moléculas, mencionadas no parágrafo anterior, além de genes com atividade nuclease, quando se alimenta de cana-de-açúcar. Simultaneamente, são suprimidos genes relacionados com metabolismo de lipídios, remodelação da membrana peritrófica, assim como genes com atividade antioxidante (catalases e peroxidases) e de detoxificação (citocromo P450).

A dieta é um dos aspectos fundamentais da fisiologia e do desenvolvimento dos insetos, principalmente nas fases larvais (em insetos holometábolos). Mesmo pequenas mudanças nutricionais, podem alterar as respostas fisiológicas, hormonais e comportamentais dos indivíduos de uma população determinada (Vogel *et al.*, 2014). Estudar as respostas moleculares mediante a quantificação da expressão gênica, associada a uma determinada condição de alimentação, tem sido possível nos últimos anos graças as tecnologias de sequenciamento como o RNA-seq.

Em um grande número de estudos foram descritas as respostas de várias espécies de insetos frente a diferentes fontes e/ou formas de alimentação (Gog *et al.*, 2014; Herde e Howe, 2014; Li *et al.*, 2016; Rispe *et al.*, 2016; Huang, Mcneill, *et al.*, 2017; Xiang *et al.*, 2018). Outros experimentos usando a mesma abordagem, focaram-se em descrever as diferenças de expressão apresentadas por diversos insetos-praga, ao serem alimentados com dietas artificiais em

comparação com dietas naturais (Roy, A. W. *et al.*, 2016; Huang, Whitman, *et al.*, 2017; Yi *et al.*, 2017). A maior parte desses trabalhos mostrou termos GO enriquecidos similares aos descritos neste trabalho.

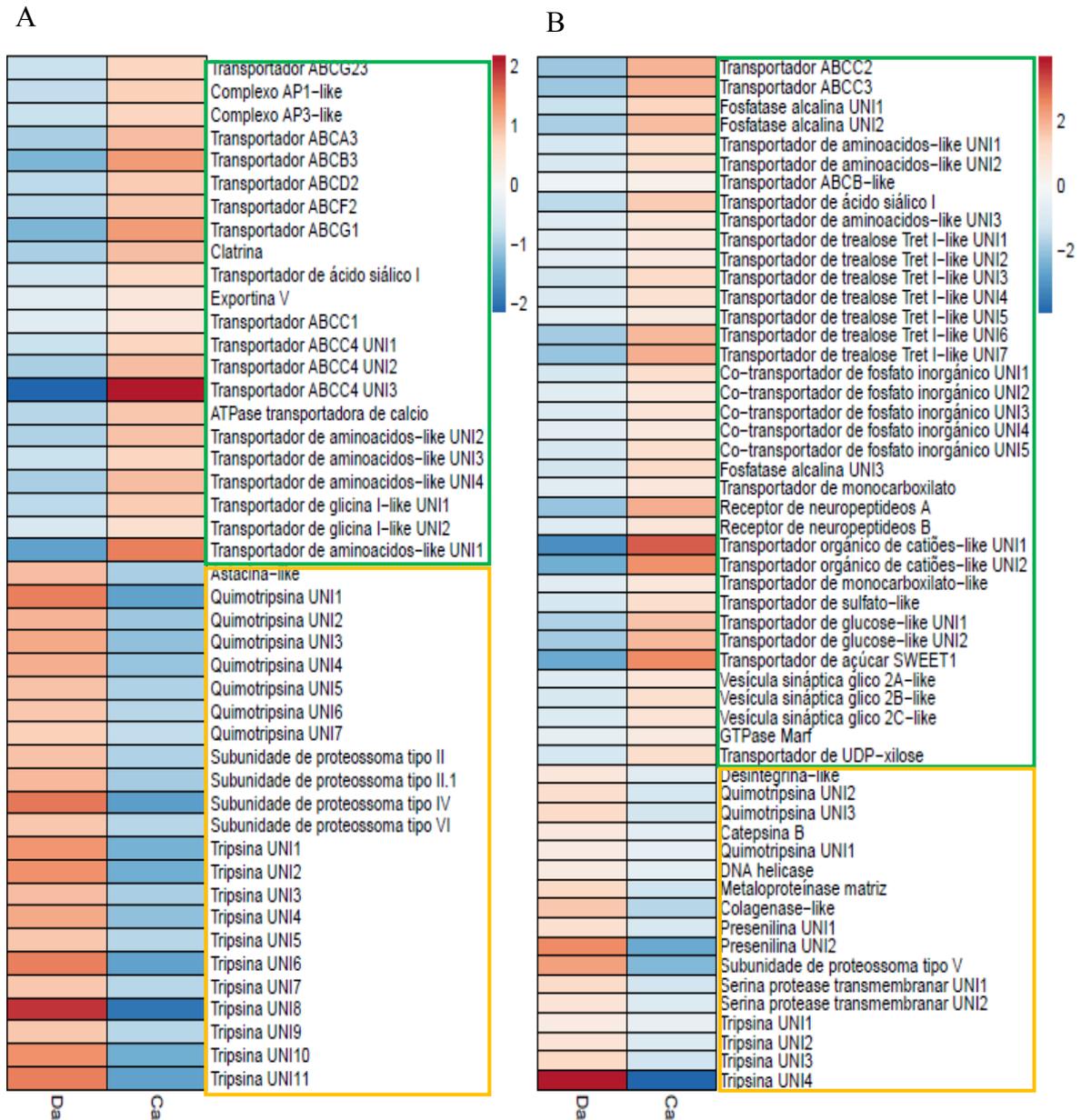
#### 4.2.4.1 Transporte de moléculas

O transporte de moléculas em insetos, está associado principalmente com processos de digestão e detoxificação. As células do intestino médio apresentam altas taxas de expressão dos genes que codificam para transportadores moleculares, necessárias para sustentar os níveis de absorção de nutrientes requeridos pelo inseto (Sehnal e Žitňan, 1996). Este tipo de genes, enriquecidos nos transcritomas de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, apresentaram os maiores níveis de expressão nos indivíduos alimentados com cana-de-açúcar (Figura 12). Um resultado semelhante foi reportado por Roy, A. W. *et al.* (2016), comparando a expressão de genes de duas espécies de insetos-praga da ordem Lepidoptera, *Spodoptera littoralis* e *Spodoptera frugiperda*, alimentadas com milho e com dieta artificial. Nesse trabalho, os autores observaram nos indivíduos alimentados com milho, maior expressão de genes relacionados com transporte de moléculas.

No caso da resposta observada neste trabalho, para *D. saccharalis* e *T. l. licus*, sugere-se que pode ser causada por duas razões. A primeira, um maior conteúdo nutricional presente na dieta natural em relação à dieta artificial, provocando um aumento de transportadores moleculares para suprir as demandas alimentícias. A segunda, aumento de transportadores com função de detoxificação, devido à presença de compostos tóxicos para o inseto, presentes em maior quantidade no colmo da cana do que na dieta artificial. Provavelmente essa última razão, explique os resultados observados em *D. saccharalis*, mas não em *T. l. licus*, inseto para o qual a primeira razão se ajusta melhor.

Por um lado, a dieta artificial usada foi bem estabelecida para broca da cana (Vacari *et al.*, 2012), mas não para broca-gigante. Esta dieta possui um conteúdo de nutrientes altamente concentrado, permitindo à broca da cana completar seu ciclo de desenvolvimento mais rapidamente do que se alimentando da cana-de-açúcar. Porém, a broca-gigante não tem apresentado uma adaptação tão bem-sucedida a dietas artificiais quanto a broca da cana (Negrisoli *et al.*, 2015). Adicionalmente, a maioria dos genes relacionados com transporte de moléculas identificados na análise de enriquecimento em *D. saccharalis*, codificam para transportadores com função de detoxificação (65%), entretanto que para *T. l. licus*, a maioria

dos genes enriquecidos codificam para transportadores relacionados com absorção de nutrientes (80%).



**Figura 12.** Mapas de calor mostrando a expressão dos genes anotados com os termos mais enriquecidos, compartilhados no conjunto de DEGs dos dois transcritomas. Na figura pode visualizar-se a expressão normalizada dos DEGs relacionados com transporte de moléculas (caixas verdes) e degradação de proteínas (caixas amarelas). A) *D. saccharalis* e B) *T. l. licus*. A abreviação UNI representa *contigs* únicos para cada gene. Ca: Insetos alimentados com cana-de-açúcar. Da: Insetos alimentados com dieta artificial. A escala de expressão, representada do lado direito de cada *Heatmap*, está determinada pelos valores de  $\text{Log}_2(\text{FPKM})$  dos transcritos.

Provavelmente *D. saccharalis* adapta-se mais facilmente à dieta artificial, expressando genes que permitam processar compostos provenientes de alguns componentes da dieta artificial, que em excesso possam resultar tóxicos. Por outro lado, *T. l. licus* super-expressa genes relacionados com absorção de nutrientes, principalmente aminoácidos e açúcares, para

melhorar a eficiência de absorção em uma dieta rica em proteínas e carboidratos. É importante destacar que inclusive observando uma resposta molecular similar para os dois insetos, os processos fisiológicos ativados podem ser diferentes. É comum observar que uma mesma rota metabólica seja explorada de forma distinta em função dos requerimentos de cada organismo.

Genes codificantes para transportadores de aminoácidos (glicina e neuropeptídios) e açúcares (Tret1, xilose, SWEET1 e VSG) foram alguns dos encontrados super-expressos no intestino da broca da cana e da broca-gigante, alimentadas com dieta artificial. Foi comprovando em outros insetos, que a expressão desses grupos de genes está fortemente regulada pelas fontes nutricionais das que o inseto se alimenta (Li *et al.*, 2016; Roy, A. W. *et al.*, 2016; Xiang *et al.*, 2018). Além desses tipos de transportadores, foram encontrados outros relacionados com detoxificação, principalmente fosfatases alcalinas ou membros da família de transportadores ABC (*ATP-binding cassette transporter*). Esses últimos, geralmente relacionados com resistência a toxinas, metabólitos secundários, pesticidas e aleloquímicos, em várias espécies de insetos (Merzendorfer, 2014).

No trabalho realizado por Zhong *et al.* (2017), estudando uma importante praga do arroz na Ásia (*Chilo suppressalis*), foi observada uma regulação da expressão de genes pertencentes à família de transportadores ABC, em função de diferentes plantas hospedeiras, mostrando uma resposta direta aos mecanismos de defesa da planta. Identificar genes da família de transportadores ABC nos transcritomas de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, é importante para a realização de futuros estudos que visam mostrar sua participação no desenvolvimento de resistência desses insetos. Principalmente resistência a métodos de controle usados frequentemente, por exemplo toxinas *Bt* ou pesticidas comerciais.

#### 4.2.4.2 Degradação de proteínas

Genes relacionados com degradação de proteínas foram encontrados sub-expressos nos insetos alimentados com cana-de-açúcar em relação aos alimentados com dieta artificial, tanto para *D. saccharalis* quanto para *T. l. licus* (Figura 12). A maioria desses genes, codificantes para endopeptisases do tipo serina protease, como tripsina e quimotripsina, foram reportados em outros estudos (Herde e Howe, 2014; Roy, A. W. *et al.*, 2016; Huang, Mcneill, *et al.*, 2017). A função principal das proteases é a degradação de proteínas em pequenos peptídeos, formando uma das primeiras etapas do processo de digestão. A família de genes que codifica para este tipo de enzimas é altamente diversa e sua evolução foi fortemente influenciada pela interação

com inibidores de proteases, produzidos por algumas plantas como mecanismo de defesa (Zhu-Salzman e Zeng, 2015).

No trabalho de Roy, A. W. *et al.* (2016) foram observados sub-expressos em insetos alimentados com dieta natural genes codificantes para tripsina e quimotripsina de *S. littoralis*. Outro estudo mostrando uma forte regulação transcricional de endopeptidases em função da dieta, realizado com o gafanhoto *Oedaleus asiaticu*, permitiu para os autores concluir que tais regulação surgiu devido a inibidores de proteases específicos de cada planta hospedeira, e não por diferenças nos conteúdos nutricionais (Huang, Mcneill, *et al.*, 2017). A explicação mais plausível para entender os resultados observados no presente trabalho, está relacionada com o tipo de nutrientes que aportam a dieta artificial e a cana-de-açúcar. O colmo da cana-de-açúcar é rico em carboidratos e apresenta um conteúdo proteico deficiente em relação à dieta artificial, que contém um teor de nutrientes balanceado em carboidratos e lipídios, mas está enriquecida com vitaminas e proteínas (principalmente caseína). Com o objetivo de otimizar a captação destes nutrientes, os insetos regulam de forma prioritária a produção de enzimas digestivas.

#### 4.2.4.3 Rotas metabólicas e genes regulados exclusivamente em *D. saccharalis*

##### 4.2.4.3.1 Sinalização celular

Genes que codificam para proteínas de sinalização, geralmente controlam processos fundamentais das células, como crescimento, diferenciação celular, apoptose e ativação de cascatas metabólicas. Em insetos, a indução de qualquer um desses mecanismos pode ser causada em resposta ao estresse (Davies *et al.*, 2014). Genes associados com este tipo de processos foram reportados diferencialmente expressos em trabalhos recentes (Rispe *et al.*, 2016; Huang, Whitman, *et al.*, 2017; Xiang *et al.*, 2018).

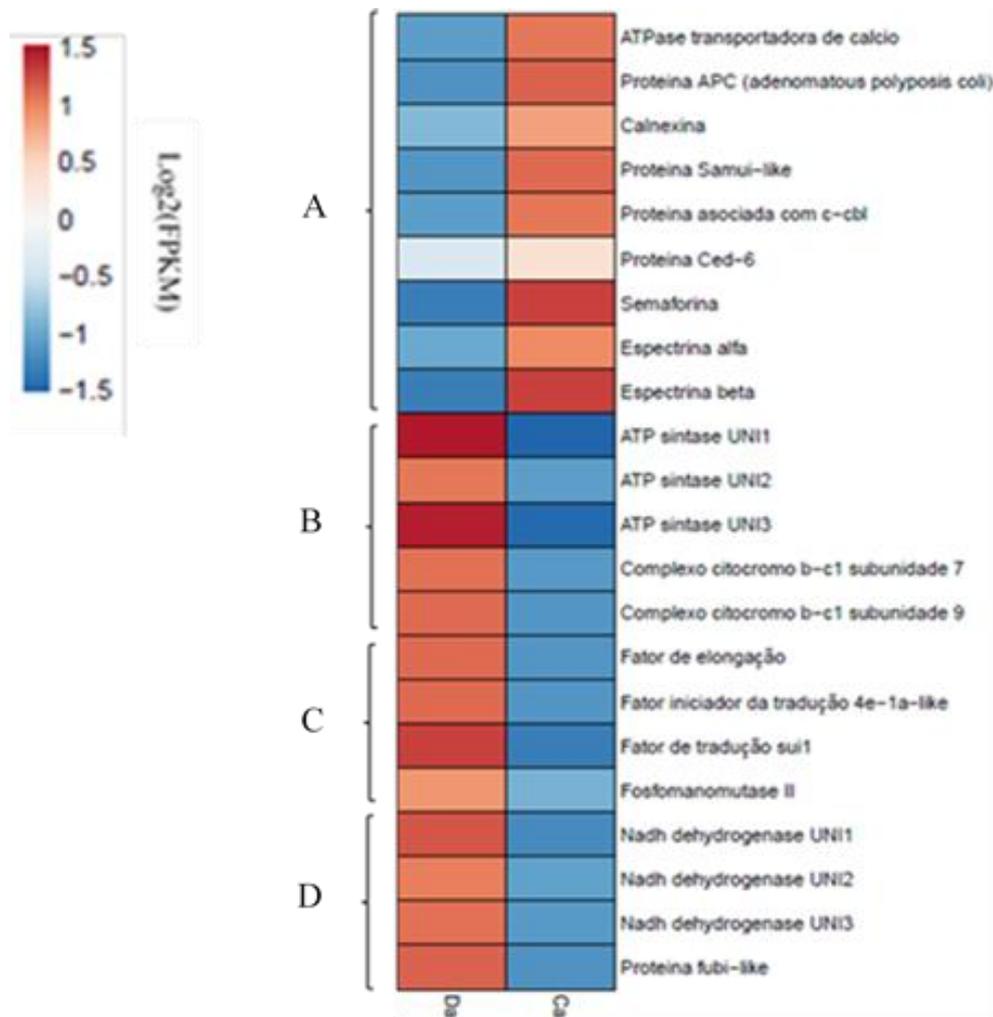
No estudo realizado por Xiang *et al.* (2018), foi analisada a expressão de genes no intestino da borboleta *Pieris rapae*, em resposta a um inibidor de proteases da planta *Cassia obtusifolia*. Foram reportados nesse estudo 46 DEGs relacionados com sinalização celular, dos quais destacaram-se genes codificantes para integrina e genes mTOR (*mechanistic target of rapamycin*). A regulação descontrolada desses genes está associada como desordens do metabolismo energético e crescimento celular anormal (Wegener e Campbell, 2008; Kim *et al.*, 2016). Da mesma forma, em *O. asiaticus* foram encontrados diferencialmente expressos diversos genes associados com regulação de sinais, em resposta a diferentes plantas hospedeiras (Huang, Whitman, *et al.*, 2017).

No caso dos resultados observados para *D. saccharalis* no presente estudo, genes relacionados com sinalização celular e transdução de sinais foram encontrados super-expressos nas larvas alimentadas com cana-de-açúcar (Figura 13). Alguns dos genes destacados são: o gene *samui*, que codifica para uma proteína relacionada com resistência ao frio em insetos (Moribe *et al.*, 2001), o gene *ced-6* que é traduzido em uma proteína com função regulatória do mecanismo de apoptose durante a metamorfose (Awasaki *et al.*, 2006), e um gene codificante para semaforina, proteína associada com a formação do sistema gastrointestinal (Yazdani e Terman, 2006). Apesar de não se conhecer o mecanismo de ação desses genes em insetos, os resultados apresentados aqui permitiram identificar genes importantes para o processo de adaptação das células do intestino, frente a condições de estresse maior como a dieta natural, em comparação a dietas artificiais. Estas últimas reduzem as condições de estresse, principalmente abiótico, devido a sua assepsia e uniformidade.

#### 4.2.4.3.2 Regulação da tradução e produção de energia

Genes reguladores da tradução são geralmente expressos em altas taxas durante o desenvolvimento de qualquer organismo, e a maioria deles expressam-se como genes constitutivos (Curtis *et al.*, 1995). Porém, genes relacionados com tradução de proteínas e produção de ribossomos foram descritos sub-expressos em insetos alimentados com dietas contendo uma baixa disponibilidade de nutrientes (Li *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2017; Xiang *et al.*, 2018). Em concordância com esses trabalhos, foi observado no presente estudo, que larvas de *D. saccharalis* alimentadas com cana-de-açúcar, apresentam uma supressão significativa de genes relacionados com regulação da tradução (Figura 13). Embora esta resposta possa dever-se a uma maior fonte de nutrientes presente na dieta artificial, também é provável que seja por causa da própria expressão diferencial de genes. Transcritos expressos em níveis diferentes, podem levar a uma maior ou menor atividade da maquinaria de tradução da célula, produzindo dessa forma as diferenças de expressão observadas para genes relacionados com regulação da tradução.

É importante mencionar que a regulação transcricional dos genes relacionados com tradução de proteínas em *D. saccharalis*, foi acompanhada com regulação no mesmo sentido de genes relacionados com produção de energia por meio da cadeia respiratória (Figura 13). Isto pode ser explicado pelo alto custo energético dos mecanismos de envolvem tradução de proteínas, conduzindo a uma maior expressão dos genes encarregados da produção de energia, com a finalidade de suprir os requerimentos energéticos do processo de tradução.



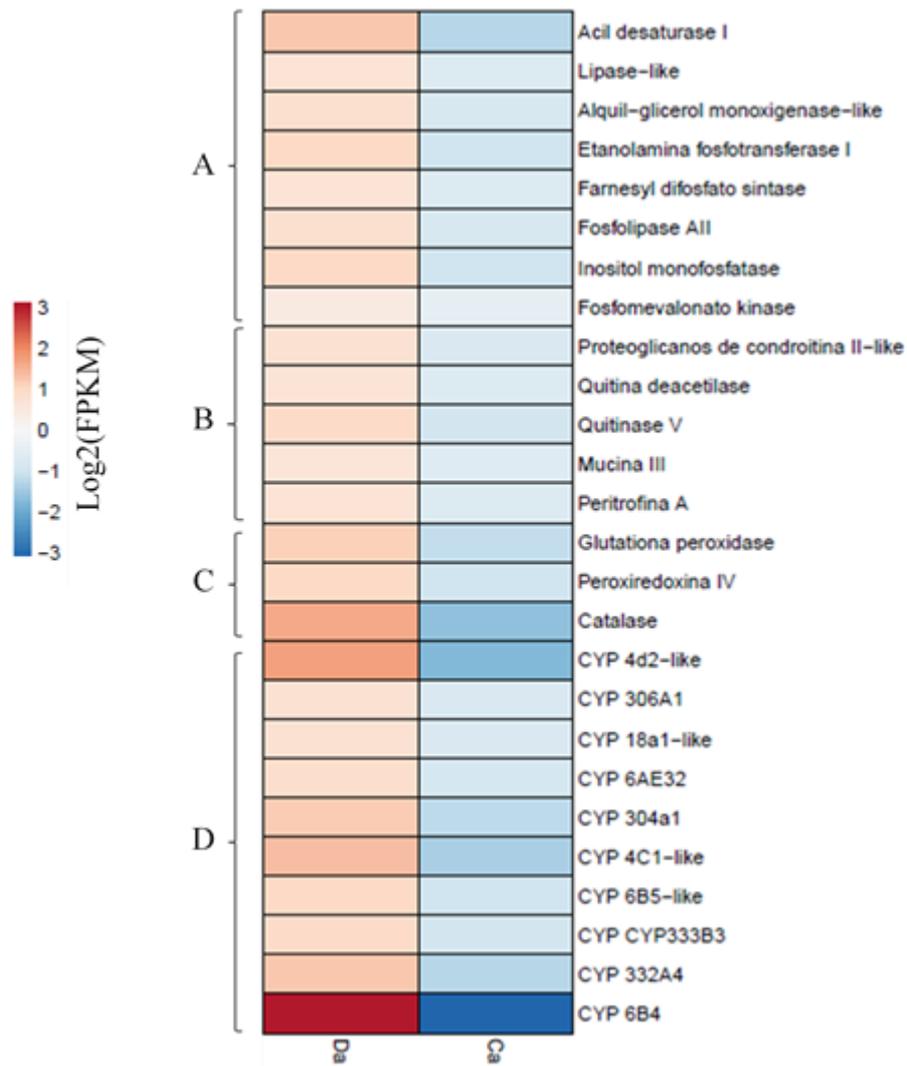
**Figura 13.** Heatmap mostrando a expressão dos genes associados aos termos mais enriquecidos, exclusivos no conjunto de DEGs do transcriptoma de *D. saccharalis*. Na figura pode visualizar-se a expressão normalizada dos DEGs relacionados com: A) Sinalização celular e transdução de sinais, B) Produção de energia pela cadeia respiratória, C) Regulação da tradução e D) Componentes estruturais da cadeia respiratória. A abreviação UNI representa *contigs* únicos para cada gene. Ca: Insetos alimentados com cana-de-açúcar. Da: Insetos alimentados com dieta artificial.

#### 4.2.4.4 Rotas metabólicas e genes regulados exclusivamente em *T. l. licus*

##### 4.2.4.4.1 Metabolismo de lipídios

Genes relacionados com metabolismo de lipídios em *T. l. licus*, foram encontrados sub-expressos no intestino dos insetos alimentados com cana-de-açúcar (Figura 14), provavelmente devido à deficiência de lipídios na cana-de-açúcar em comparação com a dieta artificial. Foi reportado em outros estudos realizados em insetos, expressão diferencial de genes associado com metabolismo de ácidos graxos, esfingolipídios, hormônios e glicolipídios, em função de diferentes dietas (Gog *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016; Roy, A. W. *et al.*, 2016; Xiang *et al.*, 2018).

No trabalho de Roy, A. W. *et al.* (2016) mais de 100 transcritos diferentes, codificantes para lipases dos intestinos de *S. littoralis* e *S. frugiperda*, foram reportados como sub-expressos nos insetos alimentados com milho em comparação aos alimentados com dieta artificial. Da mesma forma Xiang *et al.* (2018) encontraram 56 genes codificantes para lipases, sub-expressas em resposta a inibidores de proteases em *P. rapae*. Esses resultados, indicam um papel essencial das rotas metabólicas de lipídios no processo de adaptação dos insetos a diferentes condições de alimentação.



**Figura 14.** *Heatmap* mostrando a expressão dos genes associados aos termos mais enriquecidos, exclusivos no conjunto de DEGs do transcriptoma de *T. l. licus*. Na figura pode visualizar-se a expressão normalizada dos DEGs relacionados com: A) Metabolismo de lipídios, B) Remodelação da membrana peritrófica, C) Função antioxidante e D) Detoxificação. A abreviação UNI representa *contigs* únicos para cada gene. Ca: Insetos alimentados com cana-de-açúcar. Da: Insetos alimentados com dieta artificial. CYP: Citocromo P450.

#### 4.2.4.4.2 Remodelação da membrana peritrófica

A membrana peritrófica (MP) forma a primeira barreira de defesa do intestino médio em insetos, protegendo as células epiteliais de lesões físicas, assim como de toxinas. O processo de remodelação da MP é crucial para aumentar a resistência do inseto contra diferentes tipos de dano físico ou enzimático associado ao consumo de um alimento específico (Terra, 2001). As enzimas encarregadas deste processo de remodelação, pertencem principalmente às rotas de síntese e degradação de quitina. A regulação deste grupo de genes foi reportada em trabalhos similares com o apresentado aqui (Gog *et al.*, 2014; Roy, A. W. *et al.*, 2016; Huang, Whitman, *et al.*, 2017; Xiang *et al.*, 2018).

Genes codificantes para proteínas com funções específicas de restauração da MP, como quitinases, quitina deacetilase, mucina e peritrofina, foram descritos super-expressos em larvas de *Helicoverpa zea* alimentadas com tabaco, em relação a larvas alimentadas com dieta artificial (Gog *et al.*, 2014). Adicionalmente, em *P. rapae*, foi observado um aumento significativo da expressão de alguns desses genes, em resposta a inibidores de proteases (Xiang *et al.*, 2018). Em contrapartida, os mesmos genes foram observados super-expressos no intestino das larvas de broca-gigante alimentadas com dieta artificial (Figura 14). Provavelmente alguns derivados dos compostos que fazem parte da dieta artificial, não foram facilmente assimilados no intestino das lagartas de *T. l. licus*, induzindo dessa forma o mecanismo de defesa e reparo da membrana peritrófica.

#### 4.2.4.4.3 Detoxificação e efeito antioxidante

Genes relacionados com detoxificação são fortemente regulados em insetos que são submetidas a diferentes dietas, principalmente no intestino, onde esses genes expressam-se em altas taxas (Guo *et al.*, 2017). Insetos da ordem Lepidoptera respondem de forma especialmente eficiente a diferentes tipos de moléculas absorvidas pelo intestino, ativando rapidamente e de forma massiva diferentes vias de detoxificação (Wheat *et al.*, 2007). Diversos trabalhos realizados em lepidópteros, apresentam várias vias de detoxificação reguladas em função da dieta, entre elas as vias do P450, dos GSTs, dos UGTs e das CEs (Herde e Howe, 2014; Roy, A. W. *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2017; Xiang *et al.*, 2018).

No transcrito de *T. l. licus*, a maior parte dos genes regulados fazem parte da via do P450, apresentando-se super-expressos nos insetos alimentados com dieta artificial (Figura 14). Diferentemente, no trabalho realizado por (Zhang *et al.*, 2013), genes da mesma via foram

reportados sub-expressos em insetos alimentados com dieta artificial. Por outro lado, dezesseis genes dessa via em *C. suppressalis* foram descritos sub-expressos em larvas alimentadas com dieta natural, e super-expressos em larvas alimentadas com uma dieta alternativa (Zhong *et al.*, 2017). Os autores desse trabalho indicaram um papel fundamental desses genes no processo de adaptação do inseto a novas fontes de alimento. Outro resultado mostrando a participação dos genes da via do P450 como elementos de defesa essenciais, foi reportado por Xiang *et al.* (2018) para larvas de *P. rapae* tratadas com compostos ricos em glucosinolatos, os quais são altamente tóxicos para insetos.

Adicionalmente, a regulação de genes codificantes para proteínas com efeito antioxidante foi associada com a expressão de genes envolvidos na detoxificação (Roy, A. W. *et al.*, 2016; Xiang *et al.*, 2018). A enzima catalase e vários tipos de peroxidases encontradas nos trabalhos mencionados formam o principal sistema antioxidante das células, por meio da conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, evitando desta forma o estresse oxidativo (Chilian *et al.*, 2011). A expressão de genes codificantes para peroxidases e catalases no transcrito de *T. l. licus* foi concordante com a expressão dos genes da via P450, apresentando-se super-expressos nas larvas alimentadas com dieta artificial (Figura 14). Como mencionado anteriormente a partir dos resultados de (Xiang *et al.*, 2018), a super-expressão conjunta no intestino, de genes com atividade antioxidante e genes com função de detoxificação, pode ser um dos mecanismos principais para facilitar a adaptação dos insetos da ordem Lepidoptera a novos tipos de dieta.

## 5. Conclusões e Perspectivas

O estudo aqui apresentado gerou, pela primeira vez, um banco de dados em conjunto com análise de expressão gênica para duas pragas importantes da cana-de-açúcar, broca da cana (*D. saccharalis*) e broca-gigante (*T. l. licus*). Uma vez publicadas e depositadas nos bancos de dados correspondentes, as sequências aqui obtidas enriquecerão o conhecimento relacionado com a biologia molecular, fisiologia e genética dos dois insetos, contribuindo enormemente em pesquisas futuras. A anotação das sequências e a quantificação da sua expressão em diferentes condições de alimentação, aportam informação acurada de genes que podem ser potencialmente explorados para desenhar estratégias de controle por técnicas como RNAi e toxinas *Bt* (identificando receptores de toxinas Cry) entre outras.

Dentre os potenciais alvos biotecnológicos foram identificados genes relacionados com processos fisiológicos fundamentais dos insetos, como detoxificação, produção de energia, transporte de moléculas e controle da tradução, entre outros. Outro aspecto a destacar-se é que foi possível descrever a resposta geral da expressão genica que cada inseto exhibe, em função da dieta da qual se alimenta. Isto é importante para identificar processos em comum, assim como particularidades de cada inseto, que possam contribuir tanto para aumentar o conhecimento sobre aspectos evolutivos e ecológicos destes insetos, quanto para planificar estratégias de controle que possam atingir as duas pragas de forma simultânea, diminuindo assim custos relacionados ao controle das mesmas.

Finalmente é importante mencionar que é necessário desenvolver pesquisas futuras que complementem a informação gerada neste trabalho, principalmente estudos que visem validar experimentalmente os dados obtidos a partir das análises *in silico*. Alguns estudos deste tipo podem incluir a avaliação da expressão dos genes destacados neste estudo por qRT-PCR, em diferentes fases de desenvolvimento de *D. saccharalis* e *T. l. licus*. Da mesma forma, podem ser descritas rotas metabólicas importantes analisando transcritos, proteínas e regulação gênica. Visando realizar este tipo de estudos, o sequenciamento do genoma da broca da cana e da broca-gigante deve ser uma prioridade, visto que a disponibilidade de genomas de insetos é cada vez mais comum e serve como uma ferramenta de alta acurácia, para estudos em entomologia básica e aplicada.

**Capítulo II - Validação de moléculas de dsRNA com potencial para o controle de *D. saccharalis* e *T. l. licus* via administração oral.**

## 1. Introdução

### 1.1 RNA interferente

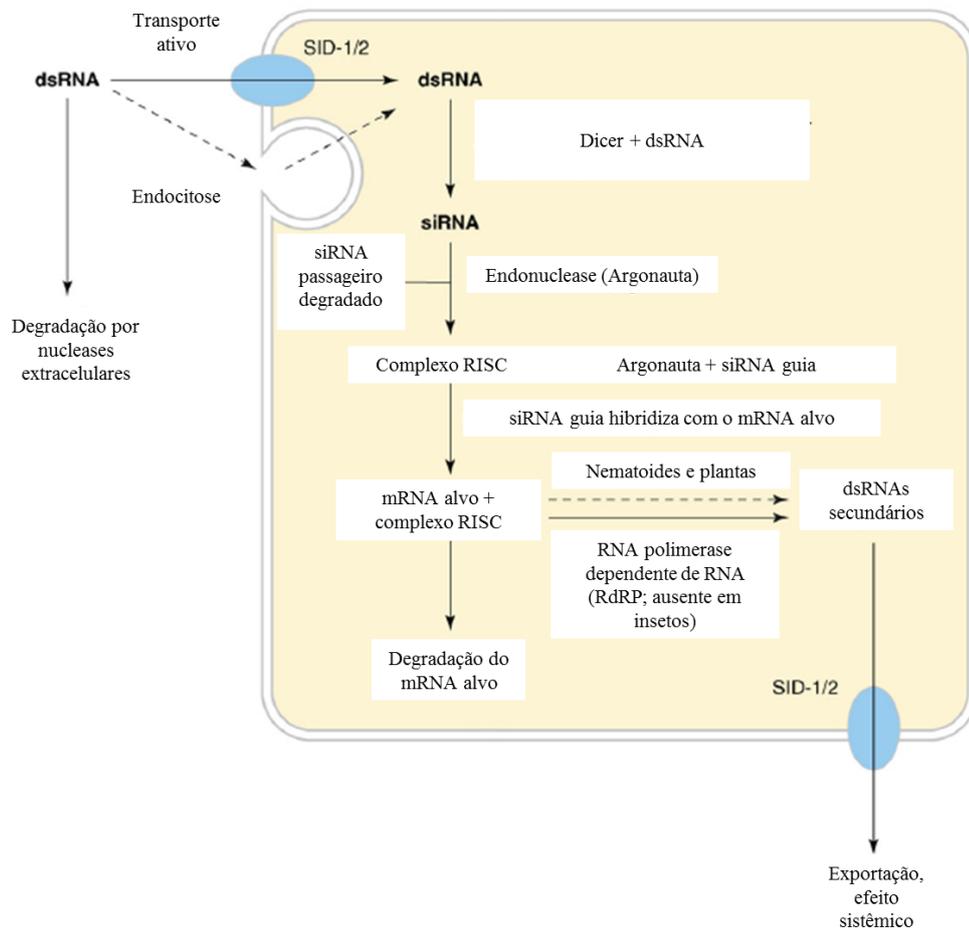
O RNA interferente é um mecanismo básico presente na maioria dos organismos eucariotos, por meio do qual é possível regular a expressão de genes de forma específica, influenciando significativamente o fenótipo dos indivíduos. Existem três funções principais associadas ao mecanismo de RNAi: regulação endógena da expressão gênica, proteção contra elementos transponíveis do genoma e defesa contra agentes virais (Zhang, J. *et al.*, 2017). Desde sua descoberta por Fire *et al.* (1998) no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*, o mecanismo de RNAi tem se mostrado como uma ferramenta experimental poderosa para o estudo da função gênica, ajudando a descrever importantes vias metabólicas. Atualmente, é considerada uma técnica com grande aplicabilidade nas áreas de saúde humana, biotecnologia e agricultura (Joga *et al.*, 2016). A aplicação do RNAi na produção de plantas resistentes a insetos-praga tem uma curta história de pouco mais de 10 anos, porém, atualmente é uma das estratégias mais promissoras no campo da biotecnologia agrícola em países como os Estados Unidos, a Índia e a China (Price e Gatehouse, 2008; Katoch *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2014).

### 1.2 Mecanismo do RNAi

O mecanismo de RNAi pode ser estudado principalmente por meio de duas abordagens: o processo de autonomia celular e o processo sistêmico (Price e Gatehouse, 2008). O processo de autonomia celular é mediado por uma maquinaria enzimática específica formada por um grupo de proteínas e cofatores que interagem em diferentes vias produzindo a interrupção da expressão gênica. O modelo melhor estudado é conhecido como silenciamento gênico pós-transcricional, que atua sobre o mRNA por duas vias diferentes: a via dos siRNAs, que produz a degradação do mRNA no citoplasma e tem complementariedade total com o mRNA, e a via dos microRNAs (miRNAs), que bloqueia a tradução de mRNA a proteína no ribossomo, e tem complementariedade parcial com o mRNA (Castel e Martienssen, 2013; Sarkies e Miska, 2014).

Com o objetivo de aplicação na geração de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga, a via dos siRNAs tem sido mais estudada (Figura 15) (Shah *et al.*, 2014). Nessa via, o dsRNA é processado no citoplasma por uma enzima denominada Dicer, que cliva seletivamente as moléculas longas de dsRNA gerando siRNAs com tamanho entre 21 e 25 nucleotídeos. Esses fragmentos são, posteriormente, incorporados em um complexo enzimático denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*). No complexo RISC, as pequenas moléculas de siRNA

servem de guia para a detecção do mRNA alvo que será clivado em pontos específicos da sequência nucleotídica por proteínas conhecidas como Argonautas. Essas proteínas possuem um domínio *RNaseH-like* contendo o sítio catalítico da enzima. A clivagem seletiva gera uma desestabilização da molécula de mRNA tornando-a susceptível a degradação por nucleases citoplasmáticas (Wang, Y. *et al.*, 2009). Adicionalmente, foi comprovada em plantas e nematóides a presença de uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) que interage com o complexo RISC e gera novas moléculas de dsRNA usando como molde os siRNAs produzidos anteriormente. Este processo funciona como um mecanismo de amplificação do sinal de RNAi aumentando eficiência do efeito de silenciamento (Sijen *et al.*, 2001). Porém, nenhum ortólogo de RdRP foi descrito em insetos até o presente momento, o que gera múltiplas questões sobre o RNAi sistêmico em espécies da classe Insecta (Huvenne e Smaghe, 2010).



**Figura 15.** Etapas funcionais do silenciamento gênico por meio de RNA dupla fita (dsRNA) em células eucariotas. Após a importação do dsRNA para dentro das células, os dsRNAs são processados pela enzima Dicer gerando pequenos RNAs de interferência (siRNAs) que, em conjunto com a proteína Argonata, são montados no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). O complexo RISC degrada mRNAs específicos baseado na sequência dos siRNAs. Os efeitos de RNAi sistêmico são mediados pela produção de novos dsRNAs pela polimerase dependente de RNA (RdRP), que usa o RNA alvo como molde e as fitas parcialmente degradadas de siRNA como *primers* para gerar novas moléculas de dsRNA. Os dsRNAs secundários podem ser exportados espalhando o efeito de RNAi a outras células. Adaptado de Price e Gatehouse (2008).

Diferente do processo de autonomia celular, o conhecimento sobre o RNAi sistêmico é menor. Entender os mecanismos envolvidos no RNAi sistêmico é um dos grandes desafios da comunidade científica para consolidar a tecnologia de RNAi no controle de insetos-praga. Segundo Huvenne & Smaghe (2010), esse processo envolve um complexo sistema de sinalização por meio do qual o efeito de RNAi pode passar de uma célula à outra, controlada por uma série de moléculas sinalizadoras. O conjunto de proteínas envolvidas no RNAi sistêmico é bem descrito em nematoides, mas pouco estudado em insetos (Price e Gatehouse, 2008). Acredita-se que existam componentes da maquinaria de RNAi em insetos que participam da amplificação e da resposta sistêmica, porém a maquinaria de RNAi é pouco descrita ao longo da classe Insecta e a maioria das diferenças presentes entre as diferentes ordens ainda permanece desconhecida (Scott *et al.*, 2013).

Estudos visando entender o processo de RNAi sistêmico em insetos foram realizados em linhagens celulares específicas de *D. melanogaster* (*S2 Cells*), onde foram identificados homólogos para genes da família SID (*Systemic RNA Interference Deficiency*). Estes genes codificam proteínas transmembrana em forma de canal descritas como mediadoras do RNAi sistêmico em *C. elegans*, por meio da absorção de moléculas de dsRNA (Ulvila *et al.*, 2006). Genes putativos da família SID tenham sido descritos na maioria dos genomas de insetos disponíveis (Scott *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015; Powell *et al.*, 2017). Porém, as conclusões sobre sua função como mediadores do RNAi sistêmico em insetos devem ser abordadas com cuidado, pois tal função foi comprovada apenas em células do tipo hemócitos, que apresentam uma alta taxa de endocitose (Tassetto *et al.*, 2017).

Outro mecanismo que explica a absorção de moléculas de dsRNA em insetos é aquele mediado pelas rotas comuns de endocitose nos insetos. Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs: *Pattern recognition receptors*) do tipo *scavengers* são reconhecidos por estar implicados no reconhecimento de moléculas de dsRNA, melhorando a eficiência de absorção via endocitose (Ulvila *et al.*, 2006). Além do processo de absorção do dsRNA, também existe a incógnita sobre a amplificação do sinal de RNAi em insetos, para a qual não há indicativo de que possa estar sendo mediada por RdRP. Acredita-se que possa existir outro mecanismo que permite a ocorrência deste processo em insetos, não obstante, ainda não foram descritos os seus componentes. Um melhor entendimento dos mecanismos de RNAi sistêmico em insetos contribuirá para a implementação desta técnica no controle de pragas, principalmente

otimizando a eficiência dos métodos de entrega das moléculas de dsRNA no inseto alvo (Zhang, J. *et al.*, 2017).

### 1.3 Métodos de entrega do dsRNA

O principal desafio para a aplicação da tecnologia de RNAi no controle de insetos-praga, diz respeito às formas de entrega das moléculas de dsRNA. O RNAi aplicado em pesquisa entomológica tem sido utilizado principalmente seguindo quatro métodos de entrega do dsRNA: microinjeção diretamente na hemolinfa do inseto, ingestão via oral usando dietas artificial ou plantas transgênicas e aplicação tópica por meio da incubação das larvas em soluções de dsRNA (*Soaking*). Contudo, só os dois últimos métodos são viáveis para validar o uso de moléculas de dsRNA no controle de insetos-praga (Yu *et al.*, 2013).

O método de microinjeção é a forma de entrega mais usada pelos grupos de pesquisa em entomologia, principalmente para validar função de genes, tendo contribuído para a melhor compreensão de processos moleculares em diversos organismos modelo como: *T. castaneum* (Tomoyasu e Denell, 2004), *D. melanogaster* (Dzitoyeva *et al.*, 2001), *B. mori* (Quan *et al.*, 2002), *Apis mellifera* (Aronstein e Saldivar, 2005), *Blatella germânica* (Martín *et al.*, 2006), entre outros. Esta forma de entrega é altamente eficiente para observar o efeito fenotípico associado à expressão de um gene específico. Isto se deve à distribuição das moléculas de dsRNA no sistema circulatório aberto do inseto, permitindo desta forma atingir um maior número de células. No entanto, não é considerado um método prático para aplicar no controle de insetos-praga (Yu *et al.*, 2013).

A entrega por ingestão das moléculas de dsRNA tem se mostrado, até o momento, a melhor opção para validar genes com potencial no controle de pragas. Em 1998, foi comprovado pela primeira vez que a ingestão de moléculas de dsRNA através das vias digestivas de *C. elegans* é eficiente para ativar a resposta do mecanismo de RNAi (Timmons e Fire, 1998). Essa estratégia foi validada posteriormente em diferentes ordens de insetos com resultados efetivos (Turner *et al.*, 2006; Baum *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2010; Surakasi *et al.*, 2011; Zha *et al.*, 2011). A entrega oral do dsRNA fornece vantagens importantes, como apresentar-se menos invasivo do que a microinjeção e ter menor dificuldade técnica ao ser aplicado em insetos pequenos (Luo *et al.*, 2017).

Existem várias estratégias para realizar a entrega oral de dsRNA, entre elas destacam-se: ingestão de bactérias recombinantes expressando moléculas de dsRNA, aplicação direta de

soluções de dsRNA na cavidade bucal do inseto, moléculas de dsRNA misturadas com dietas líquidas ou sólidas e plantas transgênicas produzindo dsRNA com estrutura em forma de *hairpin* (Yu *et al.*, 2013). Independente da estratégia utilizada, sabe-se que a entrega oral apresenta limitações para funcionar com eficiência e produzir uma resposta robusta do RNAi. Essas limitações estão relacionadas com a hidrólise do dsRNA que ocorre de acordo com o pH do intestino das diferentes espécies de insetos, a capacidade do dsRNA de atravessar a membrana peritrófica do intestino, a presença de nucleases capazes de degradar eficientemente o dsRNA e a capacidade das células do intestino para absorver as moléculas de dsRNA (Rodrigues e Figueira, 2016).

Devido às limitações mencionadas, em muitos casos, torna-se necessária a utilização de altas concentrações de dsRNA para produzir silenciamento no inseto-alvo. Contudo, a estabilidade do dsRNA no intestino e as quantidades requeridas para gerar o efeito desejado variam de espécie para espécie. Atualmente, muitos estudos na área de entomologia estão focados em resolver as limitações descritas acima, visando atingir o sucesso da aplicação do RNAi em insetos e viabilizar o controle de insetos-praga por meio de plantas transgênicas produzindo moléculas de dsRNA (Joga *et al.*, 2016).

Adicionalmente ao uso de plantas transgênicas, uma nova abordagem que vem sendo estudada visa o desenvolvimento de produtos de RNAi para aplicação em forma de *spray* (Wang e Jin, 2017). Trata-se de uma estratégia fundamentada na validação de moléculas de dsRNA por *soaking*, método pelo qual a absorção tópica do dsRNA deve ser avaliada cuidadosamente. Contudo, trabalhos conjugando outras tecnologias, como o uso de partículas estabilizadoras do dsRNA, apresentam resultados promissores para o método de entrega por *spray*. Essas partículas protegem as moléculas de degradação pela ação de nucleases e melhoram sua absorção pelas células, permitindo que o método de *soaking* seja viável no controle de insetos-praga (Karim *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

#### **1.4 RNAi para o controle de insetos-praga de impacto no setor agrícola**

A primeira planta transgênica resistente a insetos-praga, utilizando a técnica de RNAi, foi desenvolvida por Baum *et al.*, (2007), conferindo a uma variedade de milho resistência à lagarta-da-raiz do milho (*Diabrotica virgifera virgifera*; Coleoptera). Neste trabalho, as moléculas de dsRNA foram desenhadas para silenciar especificamente o gene que codifica a enzima VATP-ase, um gene essencial para a sobrevivência do inseto. As análises indicaram

alta mortalidade (>80%) nos insetos alimentados da planta de milho GM. Após esse resultado, muitos grupos de pesquisa investiram para produzir plantas GM utilizando a tecnologia de RNAi, em diversas culturas, mostrando resistência aos respectivos hospedeiros (Tabela 4) (Rodrigues e Figueira, 2016).

Cultura	Praga (espécie)	Ordem	Referência
Milho ( <i>Zea mays</i> )	<i>Diabrotica v. virgifera</i>	Coleoptera	(Mao <i>et al.</i> , 2007)
Batata ( <i>Solanum tuberosum</i> )	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Coleoptera	(Zhang <i>et al.</i> , 2015)
Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	<i>Helicoverpa armigera</i>	Lepidoptera	(Zhu <i>et al.</i> , 2012)
Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	<i>Spodoptera exigua</i>	Lepidoptera	(Zhu <i>et al.</i> , 2012)
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	<i>Nilaparvata lugens</i>	Hemiptera	(Zha <i>et al.</i> , 2011)
Tabaco ( <i>Nicotiana benthamiana</i> )	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Hemiptera	(Pitino <i>et al.</i> , 2011)
Algodão ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	<i>Anthonomus grandis</i>	Coleoptera	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2017)

**Tabela 4.** Pesquisas recentes mostrando a produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga, por meio do uso de RNAi.

Existem algumas considerações a serem avaliadas para produzir uma planta GM utilizando a tecnologia de RNAi. Evitar o processamento das moléculas de dsRNA pela maquinaria celular da própria planta é um dos aspectos mais importantes, devido às plantas também possuírem maquinaria para processar moléculas de dsRNA. Neste caso, podendo causar a diminuição significativa da eficiência do silenciamento, uma vez que as longas moléculas de dsRNA são degradadas em pequenos fragmentos antes de serem ingeridas pelo inseto alvo (Frizzi e Huang, 2010). De forma alternativa, a transformação de plantas via cloroplastos vem sendo usada em muitas espécies e apresenta-se como uma estratégia eficiente, uma vez que os cloroplastos não expressam os componentes necessários para processar moléculas de dsRNA (Zhang, J. *et al.*, 2017). Há trabalhos que comprovam a eficiência desta metodologia relatando plantas produzindo dsRNA via cloroplastos que inibem significativamente o crescimento e reprodução de *H. armigera* em plantas de tabaco com uma eficiência até 50% maior do que plantas transformadas via nuclear expressando moléculas de dsRNA no citoplasma (Jin *et al.*, 2015; Bally *et al.*, 2016). Apesar disso, a transformação via nuclear não pode ser esquecida, pois há algumas plantas e tecidos em que não é possível realizar a transformação via cloroplasto (Zhang, J. *et al.*, 2017).

Por outro lado, a literatura tem descrito um grande número de insetos que apresentam baixa resposta ou não respondem às moléculas de dsRNA administradas de forma exógena

(Zhang, J. *et al.*, 2017). Os resultados das pesquisas nesta área indicam que a eficiência do RNAi varia em função da ordem do inseto alvo, chegando, em alguns casos, em nível de especificidade em espécies. Exemplificando, respostas efetivas do efeito de RNAi foram observadas para várias espécies de coleópteros, enquanto que para os bioensaios com lepidópteros observa-se ainda, inconsistências nos resultados (Terenius *et al.*, 2011).

### **1.5 RNAi em Lepidoptera**

Atualmente, o efeito do RNAi é menos consistente nos insetos da ordem Lepidoptera do que em insetos de outras ordens. Isto representa um dos maiores desafios para aplicar a tecnologia de RNAi em diferentes espécies de insetos-praga (Kolliopoulou e Swevers, 2014; Shukla *et al.*, 2016). Terenius *et al.* (2011) analisaram os resultados descritos em mais de 50 publicações e em outros 90 estudos não publicados, onde foram aplicadas moléculas de dsRNA em lepidópteros. Apenas 38% dos experimentos realizados apresentaram um efeito de silenciamento significativo. Os autores da revisão observaram correlações da eficiência do RNAi em resposta ao método de entrega, sendo a microinjeção o mais eficiente, enquanto que a resposta a entrega oral do dsRNA mostrou um efeito significativamente menor.

Resumindo, as causas das inconsistências para a eficiência do efeito do RNAi observadas em lepidópteros, foram agrupadas por Kolliopoulou e Swevers (2014) em três tipos principais: falta de RNAi sistêmico eficiente, degradação por nucleases específicas (dsRNases) presentes tanto no intestino quanto na hemolinfa dos insetos e resposta imune aumentada por mecanismos diferentes ao de RNAi, diminuindo assim a eficiência da maquinaria necessária para processar o dsRNA. Um estudo recente tenha mostrado a existência de complexos endossomais dentro das células que capturam o dsRNA internalizando-o e evitando seu contato com a maquinaria de RNAi. A presença desses complexos endossomais pode contribuir para diminuir a eficiência do RNAi sistêmico em lepidópteros, porém, ainda é necessário esclarecer quais são os componentes envolvidos no processo de absorção de dsRNA em espécies pertencentes a esta ordem (Shukla *et al.*, 2016).

Adicionalmente, a forte adaptação imunológica dos lepidópteros, que possuem um sistema antiviral independente do mecanismo de RNAi (Kanost *et al.*, 2004), parece contribuir à pobre resposta da maquinaria de RNAi, frente a dsRNAs exógenos. Isto devido a uma provável evolução da resposta imune inata dos lepidópteros, mais eficiente que em insetos de outras ordens, que conseqüentemente gerou um menor uso da maquinaria de RNAi. Embora a

partir de uma perspectiva evolutiva esta pareça uma hipótese plausível, é necessário se demonstrar experimentalmente para entender o mecanismo evolutivo que permitiu o fenômeno mencionado (Kolliopoulou e Swevers, 2014). Finalmente, a degradação por nucleases é a causa mais estudada para explicar a baixa eficiência do RNAi em lepidópteros. Estudos avaliando a degradação de dsRNA por nucleases intestinais e da hemolinfa mostram uma eficiência de degradação significativamente maior em lepidópteros em comparação com espécies de outras ordens (Garbutt *et al.*, 2013; Wang, K. *et al.*, 2016).

Além das limitações mencionadas acima, a escolha do gene alvo é um fator de grande importância no desenho dos experimentos de RNAi, visando validar moléculas no controle de pragas da ordem Lepidoptera. Segundo reportado por Terenius *et al.*, (2011), principalmente genes relacionados com imunidade, regulação hormonal e comportamento sexual têm apresentado resultados de silenciamento efetivos em lepidópteros.

### **1.6 Seleção de genes alvo para silenciamento por RNAi**

Com o objetivo de validar o uso de moléculas de dsRNA para o controle de insetos-praga, são recomendáveis estudar genes alvo que codificam proteínas pouco conservadas visando evitar efeitos em organismos não alvo e proteínas que tenham um papel essencial na sobrevivência do inseto. Genes com um impacto direto no crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto, são geralmente utilizados como alvos de RNAi (Price e Gatehouse, 2008). Visando a entrega oral do dsRNA, muitos grupos de pesquisa têm explorado as células do intestino médio como fonte de genes alvo com potencial para uso no controle de pragas (Zhang *et al.*, 2013). Isto deve-se a que as células do intestino são as encarregadas de produzir a membrana peritrófica, um componente fundamental para a sobrevivência do inseto, atuando como barreira seletiva e suporte estrutural. Além disso, o intestino é o local onde acontece o intercâmbio de nutrientes, função essencial para a obtenção de energia do meio externo (Sehnal e Žitňan, 1996). Em adição, genes relacionados com processos de detoxificação, nutrição, metabolismo energético, estrutura de citoesqueleto, transporte de moléculas e transdução de sinais, frequentemente, se expressam em maior quantidade nas células do intestino do que em outros tecidos (Zhang *et al.*, 2013).

Em diversos trabalhos foram utilizadas técnicas de *screening* tecido-específico para identificar novos genes alvo para silenciamento no intestino dos insetos. Exemplificando, foram identificados genes relacionados com processos de desenvolvimento, como crescimento larval,

muda e metamorfose. Muitos desses genes estão fortemente regulados por hormônios e a proteína que codificam é de vida curta, fator que favorece o silenciamento por meio de RNAi evitando o efeito compensatório de proteínas de alta durabilidade. Por este motivo, os entomologistas têm se interessado fortemente nos últimos anos em avaliar esse tipo de genes como potenciais alvos de RNAi (Bai *et al.*, 2011; Ma, L. *et al.*, 2016; Gazara *et al.*, 2017; Sparks *et al.*, 2017).

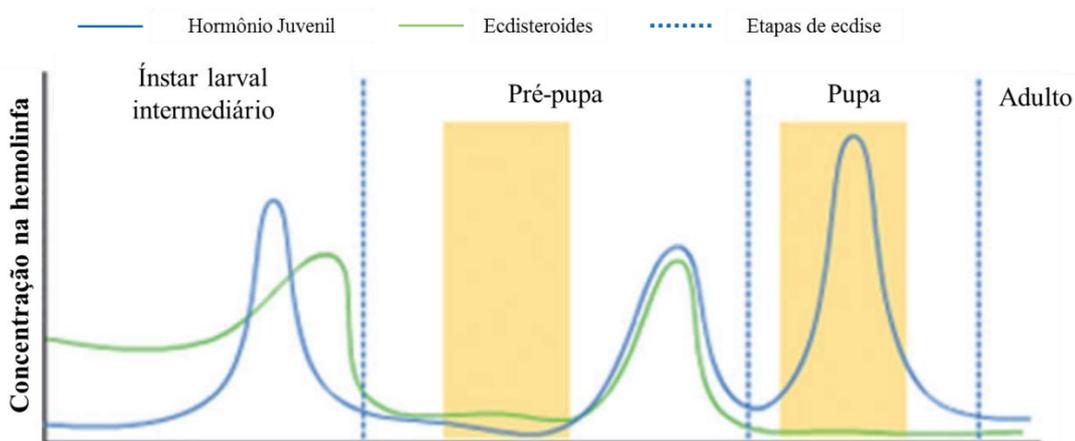
### **1.7 Hormônio juvenil e sua importância no desenvolvimento dos insetos**

O hormônio juvenil (JH) é um composto sesquiterpenóide produzido exclusivamente por insetos e crustáceos e tem como papel principal regular os processos de metamorfose e reprodução (Dahm *et al.*, 2012). Além disso, o JH controla outros processos específicos para algumas espécies de insetos como polifenismos e determinação de castas em insetos sociais (Hartfelder e Emlen, 2012). O JH é uma molécula lipofílica produzida pelas *corpora allata* (CA), um par de glândulas endócrinas situadas no cérebro de todos os insetos (Dahm *et al.*, 2012). O processo de biossíntese do JH faz parte da rota de síntese do mevalonato, uma rota metabólica presente em todos os seres vivos, incluindo humanos. Em humanos e outros mamíferos, a rota do mevalonato participa na produção de colesterol a partir de farnesil pirofosfato. Em insetos e crustáceos, que não produzem colesterol, essa parte da rota é substituída pela via de síntese do JH (Röller *et al.*, 1967). Até o momento, foram descritas oito formas diferentes do JH, sendo o JH III a variante mais comum presente na maioria de espécies. Adicionalmente, 4 variantes (JH 0, JH I, JH II e 4-Metil-JH I) foram descritas como exclusivas para lepidópteros (Noriega, 2014).

Os três eventos fundamentais do desenvolvimento dos insetos (crescimento, muda e metamorfose), são controlados por meio do JH e o esteróide 20-Hidroecdisona (20E) (Riddiford, 2012). A função do JH em cada evento está determinada por um complexo processo que regula a concentração do hormônio na hemolinfa dos insetos. Este processo envolve várias vias de sinalização, biossíntese e degradação, que mantêm o nível de JH necessário para o inseto em cada etapa do desenvolvimento (Noriega, 2014).

O mecanismo básico de regulação do desenvolvimento mediado por JH e 20E funciona alternando a produção e os níveis de concentração destes dois hormônios na hemolinfa, em função da etapa de desenvolvimento do inseto (Figura 16). Normalmente, a concentração de JH é alta em cada fase larval, ajudando a manter as características morfológicas da larva. O 20E é

produzido quando o inseto atinge o tamanho necessário para cada muda, ativando dessa forma o hormônio ecdisona. Uma vez ativado o processo de ecdise, a concentração de 20E baixa consideravelmente e a concentração de JH aumenta, bloqueando os eventos que preparam o inseto para a metamorfose. Uma vez que o processo de muda é concluído, os níveis de ecdisona, 20E e JH se estabilizam (Riddiford, 1994; Riddiford *et al.*, 2003).



**Figura 16.** Esquema ilustrando os níveis relativos do hormônio juvenil e ecdisteróides em insetos holometábolos durante as últimas etapas do ciclo de vida, desde o penúltimo ínstar larval até a fase de adulto. As barras amarelas correspondem a períodos de jejum do inseto. Adaptado de Cheong *et al.* (2015).

Em acréscimo, a concentração do JH também pode ser ajustada em níveis intermediários durante o período de alimentação entre as mudas do período larval com o objetivo de manter a proliferação isomórfica dos discos imaginais (Truman *et al.*, 2006). Na fase final de desenvolvimento do inseto, quando a larva atingiu o tamanho máximo da espécie (período de pré-pupa), a concentração do hormônio juvenil baixa, ao mesmo tempo que aumenta a produção de 20E. Isso gera uma combinação única de altos níveis de ecdisona com baixos níveis de JH favorecendo que o inseto passe para a fase de pupa (Riddiford, 2012). Posteriormente, quando que o adulto emerge, a concentração de JH varia dependendo do sexo e dos eventos reprodutivos de cada espécie (Giray *et al.*, 2005).

As mudanças dinâmicas de concentração do JH na hemolinfa dos insetos são moduladas principalmente pelas vias de biossíntese e degradação do hormônio, as quais são catalisadas por diferentes conjuntos de enzimas (Cheng *et al.*, 2014). O processo de biossíntese é controlado por 13 enzimas (Riddiford, 2012), das quais quatro foram validadas funcionalmente por RNAi em insetos, sendo uma delas validada em lepidópteros (Nyati *et al.*, 2013; Minakuchi *et al.*, 2015; Maligeppagol *et al.*, 2017; Zha *et al.*, 2017). Por outro lado, o processo de degradação é controlado por três enzimas: esterases do JH (JHE), epóxido hidrolases do JH (JHEH) e diol quinases do JH (JHDK)(Cheng *et al.*, 2014).

## 1.8 Enzimas da via de degradação do hormônio juvenil

As três enzimas que participam na degradação do JH, JHE, JHEH e JHDK, estão bem descritas para várias espécies de insetos e suas funções foram validadas por RNAi em diferentes trabalhos. Esses trabalhos relatam o efeito letal do silenciamento de genes que codificam algumas das enzimas mencionadas, produzindo larvas de tamanho anormal, deformações na pupa e nos adultos, larvas com atrofia após a muda, entre outros efeitos (Fu *et al.*, 2015; Gu *et al.*, 2015; Vatanparast *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017). Outros trabalhos, principalmente aqueles conduzidos no bicho-da-seda (*B. mori*), mostraram que o silenciamento de genes envolvidos na degradação do JH levou ao aumento significativo da produção de seda, prolongando a fase larval e aumentando o tamanho do casulo (Mamatha *et al.*, 2016; Zhang, Z. *et al.*, 2017).

É importante mencionar que alguns dos genes que codificam para as enzimas da via de degradação do JH apresentam expressão significativa no sistema digestivo de alguns insetos, regulando funções específicas não só do desenvolvimento do inseto, mas também da homeostase do intestino constituindo-se, dessa forma, como genes promissores para o controle por meio de RNAi (Jesudason *et al.*, 1992; Rahman *et al.*, 2017).

### 1.8.1 Esterase do hormônio juvenil

As esterases do JH são um conjunto de enzimas altamente específicas responsáveis por hidrolisar o éster metílico da porção terminal do JH resultando na conversão do éster metílico em ácido carboxílico. A especificidade do JHE deve-se a uma alta razão  $k_{cat}/K_m$  e a presença do motivo GQSAG na sequência primária da proteína, próxima ao sítio catalítico (Kamita *et al.*, 2003). O mecanismo catalítico da enzima é similar ao descrito para outras lipases e esterases que apresentam a denominada tríade catalítica formada por um nucleófilo (Serina-203), uma base (Histidina-448) e um ácido (Glutamato-334) formando o sítio catalítico da enzima (Ward *et al.*, 1992). Os relatos de silenciamento do gene que codifica a JHE mostraram resultados promissores para utilização do gene como alvo para controle de pragas. *Knock-down* deste gene no lepidóptero *Sesamia nonagrioides* resultou em altas porcentagens (>85%) de pupas e adultos com deformações morfológicas resultando em indivíduos reprodutivamente inviáveis (Kontogiannatos *et al.*, 2013). A validação funcional desse gene por entrega oral de dsRNA foi testada em *H. armigera* gerando alta taxa de mortalidade (Vatanparast *et al.*, 2017). A especificidade da enzima JHE para degradar unicamente o JH e sua relevância no desenvolvimento dos insetos torna o gene *jhe* um alvo para RNAi de grande interesse.

## **2. Objetivo geral**

- Validar a função do gene que codifica a esterase do hormônio juvenil em *D. saccharalis* e *T. l. licus*, e avaliar o potencial da técnica de RNAi no controle destes insetos.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Identificar genes que codificam a esterase do hormônio juvenil nos transcritomas de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, e selecionar de sequências para validar por RNAi.

- Desenhar e sintetizar moléculas de dsRNA específicas com base nas sequências selecionadas para *D. saccharalis* e *T. l. licus*.

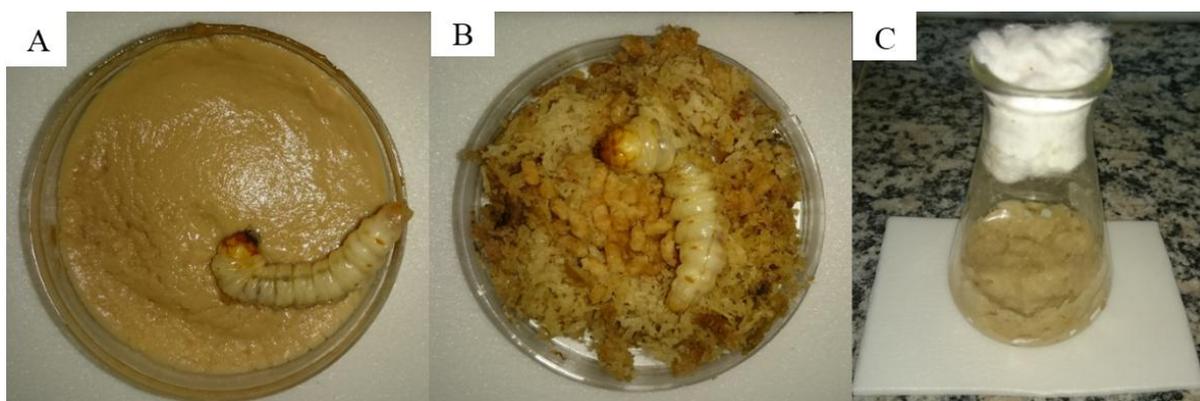
- Avaliar a eficiência de silenciamento dos genes selecionados em *D. saccharalis* e *T. l. licus*.

- Avaliar o efeito da entrega oral de moléculas de dsRNA na sobrevivência de *D. saccharalis* e *T. l. licus*.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Insetos

Larvas de ínstares intermediários de *T. l. licus* foram coletadas diretamente de campos de cana-de-açúcar infestados. Devido à falta de informação sobre o número exato de ínstares que a broca-gigante apresenta em condições de laboratório, os experimentos foram conduzidos usando larvas de penúltimo e último instar. Estes ínstares são facilmente reconhecidos observando o tamanho da cápsula cefálica ( ) das lagartas duas mudas antes da fase de pré-pupa. Dieta artificial (Anexo I) foi utilizada nos bioensaios com larvas de *T. l. licus* (Figura 17A). Para manutenção dos insetos após bioensaios, as lagartas foram mantidas em placas TPP de fundo chato (Teratec) a  $28 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa e fotoperíodo de 12/12 h (C:E) e alimentadas com pedaços de colmo de cana, substituídos a cada três dias (Figura 17B).



**Figura 17.** Material usado para manutenção de *T. l. licus* e *D. saccharalis*. A) Broca-gigante em placas contendo dieta artificial. B) Broca gigante em placas contendo colmo de cana-de-açúcar. C) Frascos erlenmeyer contendo dieta artificial, para criação de brocas da cana.

Massas de ovos de *D. saccharalis* foram cedidas pelo Dr. Aldomário Santo Negrisoni Júnior, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros no estado de Alagoas. Os ovos foram colocados em frascos tipo erlenmeyer de vidro de 125 mL (previamente autoclavados), contendo 50 mL de dieta artificial. A boca dos frascos foi vedada com fibra de algodão (Figura 17C). Posteriormente, os frascos foram transferidos para B.O.D e mantidos a temperatura média de  $26^\circ \pm 2$ , umidade relativa a 70% e fotoperíodo de 12/12 h.

#### 3.2 Identificação do gene da JHE nos transcritomas de *D. saccharalis* e *T. l. licus*

A partir dos transcritomas do intestino médio de *T. l. licus* e *D. saccharalis*, foram identificadas sequências ortólogas ao gene que codifica para a esterase do hormônio juvenil (*jhe-like*). Para *T. l. licus* foram identificadas quatro sequencias e para *D. saccharalis* uma. Foi

identificada a ORF de cada uma das sequências e a sequência de aminoácidos codificada para cada ORF. Posteriormente, foi realizado um alinhamento com a sequência proteica dos genes identificados e sequências reportadas para outros insetos nas bases de dados (GeneBank) do NCBI. Para realizar o alinhamento foi utilizado o algoritmo Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011). Posteriormente, a árvore filogenética foi obtida usando o algoritmo de Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987) a partir das distâncias calculadas por meio de a matriz de aminoácidos Jones–Taylor–Thornton (JTT), usando o programa MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). A acurácia da topologia da árvore filogenética foi avaliada por análise de *Bootstrap* usando 500 repetições.

Com base nos resultados da análise filogenética, foram selecionados os transcritos que apresentaram maior similaridade com o gene codificante para a esterase do hormônio juvenil (*jhe*) descrito para outros lepidópteros. Finalmente, a caracterização *in silico* da estrutura primária das proteínas preditas foi realizada usando a ferramenta Motif Scan ([https://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](https://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)) do instituto suíço de bioinformática (SIB: Swiss institute of bioinformatics). As figuras mostrando os principais motivos e domínios das sequências selecionadas foram geradas pelo programa BioEdit versão 7.2.5 (Hall *et al.*, 2011).

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

Para a extração de RNA total dos insetos, partindo das diferentes fases de desenvolvimento e dos insetos usados nos bioensaios, foi utilizado o reagente TRIZOL (Invitrogen Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Os RNAs foram tratados com DNaseI para eliminar possíveis resíduos de DNA genômico. Após a etapa de purificação, a qualidade e a integridade das amostras de RNA foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotometria, usando o equipamento NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific). Quantidades equimolares de 2 µg de RNA foram usadas em todas as reações de síntese de cDNA fita simples, utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen Life Technologies) e Oligo-dT30, seguindo as instruções do fabricante.

### **3.4 Desenho, síntese e teste de primers**

Para o desenho e síntese dos *primers* foram utilizadas as sequências do gene *jhe*, previamente identificadas para broca da cana e broca-gigante. Adicionalmente, a partir do transcrito de *D. saccharalis*, foram selecionadas sequências de seis genes constitutivos as quais foram avaliadas como genes de referência em reações de qRT-PCR. Os genes de

referência para *T. l. licus* foram selecionados a partir dos resultados de análises realizadas por De Assis Fonseca (2013).

O desenho dos *primers* para cada um dos genes selecionados foi realizado utilizando a ferramenta PrimerQuest Tool (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Os fragmentos para amplificar foram desenhados com tamanhos entre 140 e 160 pb, com o intuito de evitar tamanhos muito diferentes a serem utilizados na qRT-PCR. A síntese dos *primers* foi realizada pela empresa MacroGen Inc<sup>®</sup> (<https://dna.macrogen.com/eng/>). A lista completa dos genes e as sequências dos *primers*, está apresentada na tabela 5. O teste dos *primers* foi realizado por PCR convencional, usando como molde o cDNA obtido de larvas de *D. saccharalis* e *T. l. licus*.

**Tabela 5.** Genes usados para as análises de expressão por qRT-PCR, com seus *primers* correspondentes. Fw: corresponde ao *primer* senso. Rv: corresponde ao *primer* antisenso.

Espécie	Gene	Nome dos <i>primers</i>	Sequência dos <i>primers</i> 5' – 3'
<i>T. l. licus</i>	Proteína ribossomal S18 (RPS18)	FwTIRPS18q RvTIRPS18q	ACGGTGAAAATCCAGTTTGG GGACACGGATTCCCAGTAGA
<i>T. l. licus</i>	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase (GADPH)	FwTIGADPHq RvTIGADPHq	AAAGTAAAGGAGGCCGCTGT CAGCAGCATACGAAGATGGA
<i>T. l. licus</i>	Esterase do hormônio juvenil (JHE)	FwTIJHEq RvTIJHEq	GTCAACATCGTTTCTGGATGG GCTGTTCCC GTTGTATAAGC
<i>D. saccharalis</i>	β-Actina (βAct)	FwDsBActq RvDsBactq	ATGCAGAAAGAGATCACTGC GATCCACATCTGTTGGAAGG
<i>D. saccharalis</i>	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase (GADPH)	FwDsGADPHq RvDsGADPHq	CATCAAGCAGAAGGTCAAGG GTTGTCATTGAGTGAGATACCG
<i>D. saccharalis</i>	Proteína Ribossomal S10 (RPS10)	FwDsRPS10q Rv DsRPS10q	TGATCGCTTCAGTGTTGCTG TCTCAAATCCAGGGGTTACG
<i>D. saccharalis</i>	β-Tubulina (βtub)	FwDsBtubq RvDsBtubq	CAAGAACTCGTCCTACTTCGTC CGGTGAACTGTTCCGAGATG
<i>D. saccharalis</i>	Ubiquitina (UBQ)	FwDsUBQq RvDsUBQq	TCTACACTACATCTTGTCTTGC GGATACCTTCCTTGTCTTGG
<i>D. saccharalis</i>	Fator de alongação II (E2F)	FwDsE2Fq RvDsE2Fq	CGACTTCAGGAATCAAACGG AGAGGAACACTTCTATCTCACC
<i>D. saccharalis</i>	Esterase do hormônio juvenil (JHE)	FwDsJHEq RvDsJHEq	CCGAACACAGTACTTCCAAGG ACAGGTGACGACTCACAAAG

### 3.5 RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)

Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas no termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, EUA), utilizando *primers* específicos para cada gene (Tabela 5). Cada reação teve volume final de 10 µL, sendo 5 µL de SYBR Green GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation), 2 µL de cDNA diluído 50 vezes a partir do volume final de reação de síntese de cDNA; 2 µL de água bidestilada e deionizada e 0,2 µM de cada *primer* (senso e antisenso). O programa dos ciclos das reações foi o seguinte: 95 °C por 15 minutos, seguidos por 40 ciclos de incubações a 95 °C por 15 segundos e a 60 °C por 1 minuto. Ao final dos 40 ciclos, uma curva de dissociação para cada fragmento amplificado (60-94 °C, a cada 0,5 °C por 1 segundo) foi feita para verificar a possível formação de dímeros dos *primers* ou contaminação na amostra. As reações de qRT-PCR foram feitas em triplicata segundo as diretrizes de Broeders *et al.* (2014). Controles negativos contendo água ao invés de cDNA foram incluídos para verificar contaminações nas amostras.

A eficiência dos *primers* em cada reação foi calculada individualmente a partir do programa qPCR miner ([www.miner.ewindup.info](http://www.miner.ewindup.info)), com o qual também foram recalculados os valores de Cq (*quantification cycle*), usados posteriormente para avaliar a expressão dos genes de interesse (Zhao e Fernald, 2005). A análise de estabilidade da expressão de cada gene constitutivo de *D. saccharalis*, foi realizada usando o algoritmo geNORM (Vandesompele *et al.*, 2002). Para esta análise foram avaliadas 15 amostras de cDNA de diferentes condições, incluindo as fases de desenvolvimento e tratamentos com dsRNA entregue por via oral e microinjeção. Foram selecionados os dois pares de *primers* que apresentaram o melhor índice de estabilidade segundo o geNORM, e usados posteriormente como genes de referência para os experimentos de qRT-PCR.

A análise de expressão foi realizada utilizando o programa qbase plus (Biogazelle), por meio da determinação da expressão relativa normalizada, usando os parâmetros padrão do programa (Hellemans *et al.*, 2007). A escala utilizada para representar as porcentagens de expressão foi estimada usando como referência a amostra com o máximo valor de expressão. Desta forma, os valores de expressão relativa 1 e 0, correspondem ao 100% e 0%, respectivamente. A significância estatística entre tratamentos foi estimada aplicando a série Taylor (TS: *Taylor series*), usando o programa REST2009 (Pfaffl *et al.*, 2002). As figuras representando os resultados de expressão foram realizadas usando o programa SigmaPlot 12.0 (Systat Programa Inc). Para comparar a eficiência do silenciamento, entre os diferentes

tratamentos aplicados nos bioensaios para cada espécie, foi realizada a análise estatística por meio de ANOVA *one way*, seguida do teste de comparação múltipla de Tukey (TSD), usando as médias das porcentagens de redução relativa do gene *jhe*.

### 3.6 Determinação do perfil de expressão do gene *jhe*

O perfil de expressão do gene *jhe* em *D. saccharalis* (*Dsjhe*) e *T. l. licus* (*Tljhe*) foi determinado ao longo do ciclo de vida dos dois insetos, assim como entre os tecidos intestino e carcaça de larvas de último ínstar. Extração de RNA total e síntese de cDNA foi realizada para *D. saccharalis*, nas fases de ovo, neonato, larva de terceiro ínstar, larva de penúltimo (quinto) ínstar, e último (sexto) ínstar, pré-pupa, pupa e adulto. Para *T. l. licus* foi realizado o mesmo procedimento, para as fases de larva de penúltimo ínstar, larva de último ínstar, pré-pupa, pupa e adulto. Da mesma forma, foi obtido separadamente o cDNA do intestino médio e da carcaça, de larvas de penúltimo ínstar de ambos insetos. Posteriormente, a expressão do gene *jhe* foi quantificada por qRT-PCR entre as diferentes amostras de cDNA. Para cada extração foram utilizados 5 indivíduos e cada uma foi realizada em triplicata.

### 3.7 Desenho e síntese do molde para dsRNA

O desenho dos *primers* foi realizado usando o programa PrimerQuest, com base na avaliação de sequência realizada usando o programa BLOCK-iT™ RNAi Designer (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress>), que analisa as sequências e indica regiões com maior probabilidade de sucesso para experimentos de RNAi. Os *primers* desenhados para o gene *Tljhe*, foram 5' TATCCTGCGATGAAGGTTGC 3' e 5' CCATCCAGAAACGATGTTGAC 3', das fitas senso e antisenso respectivamente. Os *primers* desenhados para o gene *Dsjhe* 5' AGACATTAGAGCAGCGTTGAG 3' e 5' ACCGATGGCACGAATACAG 3' das fitas senso e antisenso respectivamente. A sequência do promotor de transcrição T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGGAGA 3'), requerida para a síntese de dsRNA, foi adicionada no início da extremidade 5' de cada uma das sequências de oligonucleotídeos.

Os fragmentos de DNA foram amplificados por PCR nas seguintes condições: 2 µL de cDNA obtido fase larval de cada inseto, diluído 50 vezes a partir do volume final da reação de síntese de cDNA, tampão de PCR 1X, 0,4 mM de dNTP mix, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,48 µM de *primers*; 2,5 U da enzima Taq DNA polimerase Ludwig Biotec, em um volume final de 20 µL. Os parâmetros usados para os ciclos de amplificação foram os seguintes: 95 °C por 5 minutos,

seguido de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Cada produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 1%, e o fragmento específico de cada gene foi purificado utilizando o kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida o DNA purificado foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific). O material purificado foi clonado em vetor pGEM®-T Easy utilizando a enzima ligase T4 (Promega Corporation), de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 15ng do produto da ligação foram utilizadas para transformar células de *E. coli* OmniMAX™. Após a transformação, foi realizada a extração do DNA plasmidial usando o kit Plasmid Mini Kit (Qiagen) e as amostras foram encaminhadas para sequenciamento e confirmação da sequência de DNA. Adicionalmente, foi realizada a extração do DNA plasmidial por meio de lise alcalina (Ahn *et al.*, 2000), para obter quantidades suficientes de DNA molde para a reação de transcrição do dsRNA. O DNA molde foi obtido por PCR usando DNA plasmidial e os *primers* específicos mencionados no parágrafo anterior.

### **3.8 Expressão *in vitro* das moléculas de dsRNA**

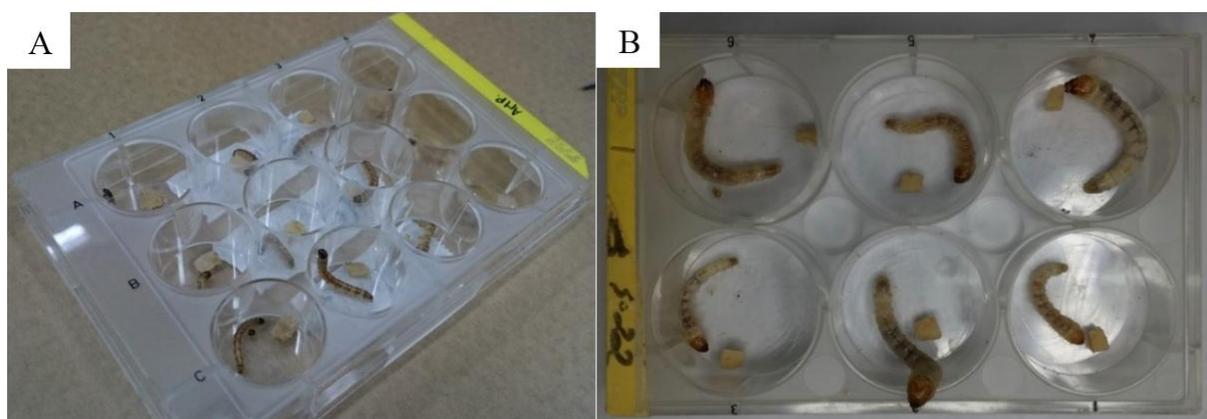
A síntese de dsRNA foi realizada utilizando 2 µg de produto de PCR como molde para um volume total da reação de transcrição de 20 µL, conforme o protocolo do kit MEGAscript® T7 High Yield (Ambion). A reação foi incubada por 16 horas a 37 °C, seguido por tratamento com DNase I (Invitrogen) por 15 minutos. Os produtos da reação foram incubados a 70 °C por 5 minutos e resfriados em temperatura ambiente para permitir o anelamento das fitas complementares de RNA. Para purificação dos produtos da transcrição seguiu-se uma extração com fenol/clorofórmio e subsequente precipitação com álcool isopropílico, conforme descrito no protocolo do fabricante. O dsRNA foi dissolvido em tampão Tris 10 mM (pH 8,0) diluído em água trada com DEPC. A quantificação foi obtida por espectrofotometria e a integridade das moléculas de dsRNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%.

### **3.9 Bioensaios com *D. saccharalis* e *T. licus licus***

Para a realização dos bioensaios, foram testadas duas formas de entrega do dsRNA: microinjeção e administração oral por meio de dieta artificial. Para o procedimento de microinjeção, larvas de penúltimo ínstar foram previamente mantidas em gelo por 15 minutos para reduzir o seu metabolismo. A microinjeção foi realizada com microseringa (Hamilton Co.), tipo Gastight com conexão Luer (LT), modelo 1701LT, volume 10 µL, com agulha de 51

mm, gauge 26S, estilo de ponta 4 e bisel de 12° (Allcrom). A região dos pseudópodes foi escolhida para a microinjeção, tomando cuidado para não deixar extravasar a hemolinfa e não perfurar o intestino. Duas soluções de controle foram utilizadas: uma contendo Tris 10 mM (pH 8,0) e outra contendo moléculas de dsGFP.

O procedimento de entrega oral por meio de dieta artificial esteril, consistiu na aplicação das soluções de dsRNA ou das soluções controle sobre pedaços de dieta sólida em forma de cubo com dimensões de 1 cm<sup>3</sup>. Larvas de penúltimo instar, colocadas previamente em jejum durante 24 h, foram depositadas individualmente em placas com seis poços (em bioensaios com a broca-gigante) e com 12 poços (em bioensaios com a broca da cana), até consumirem totalmente os pedaços de dieta adicionados de dsRNA ou solução controle (Figura 18). Depois de tratados, tanto por microinjeção quanto por entrega oral, os indivíduos foram transferidos para dieta artificial pura e mantidos a 28 ± 2 °C, 70 ± 10% de umidade relativa e fotoperíodo de 12/12 h (C:E). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas utilizando 4 larvas em cada réplica.



**Figura 18.** Placas usadas para o bioensaio com moléculas de dsRNA em larvas de *D. saccharalis* (A) e larvas de *T. l. licus* (B). A figura apresenta o momento no qual pedaços de dieta contendo moléculas de dsRNA são administradas para as larvas.

### 3.9.1 Avaliação da quantidade de dsRNA ótima

Seguindo os procedimentos de entrega oral e microinjeção descritos para os bioensaios, foram testadas diferentes quantidades de dsRNA para avaliar a dose ótima do efeito de silenciamento. Quatro larvas do penúltimo ínstar foram usadas como unidade experimental, tanto para *D. saccharalis* quanto para *T. l. licus*. As quantidades de dsRNA testadas foram 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg, 5 µg e 10 µg. Os insetos foram coletados 72 horas após o tratamento. De cada unidade experimental, foram coletados os insetos inteiros e extraído RNA total, para posterior síntese de cDNA e análise da expressão do gene *jhe* por qRT-PCR.

### 3.9.2 Avaliação do tempo ótimo para o efeito de silenciamento

Diferentes tempos de incubação do bioensaio foram avaliados, visando determinar o tempo ótimo e a persistência do efeito de silenciamento. Esta análise foi realizada exclusivamente para os bioensaios utilizando a entrega oral do dsRNA. Insetos tratados com 1 µg de dsRNA, foram coletados 24, 48, 72, 120 e 168 horas após o tratamento. A hora zero foi designada como o momento no qual o inseto consumiu totalmente o pedaço de dieta adicionado no tratamento. De cada unidade experimental, foram coletados os insetos inteiros e extraído RNA total, para posterior síntese de cDNA e análise da expressão do gene *jhe* por qRT-PCR.

### 3.9.3 Avaliação da resposta localizada de silenciamento no intestino

Para avaliar a eficiência de silenciamento localizada no intestino médio de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, e compará-la com a eficiência do silenciamento sistêmico, foram tratadas 4 larvas de penúltimo ínstar de cada inseto, por meio de entrega oral do dsRNA, conforme ao procedimento mencionado anteriormente no texto. Foram testadas as seguintes quantidades de dsRNA: 0,1 µg, 1 µg e 10 µg. Os insetos foram coletados 72 horas após a ingestão total da dieta contendo as moléculas de dsRNA. Em seguida, foi extraído separadamente RNA total da carcaça e do intestino, para posterior síntese de cDNA e validação da expressão do gene *jhe* por qRT-PCR.

### 3.9.4 Avaliação do efeito fenotípico produzido pelo silenciamento do gene *jhe*

Para observar o efeito fenotípico associado ao silenciamento do gene *jhe* em *D. saccharalis* e *T. l. licus*, larvas de penúltimo e último ínstar das duas espécies foram tratadas pela entrega oral das moléculas de dsRNA. A unidade experimental foi constituída por 15 larvas e foram testadas duas quantidades de dsRNA (0,5 µg e 5 µg), cada uma aplicada duas vezes, num intervalo de 96 horas depois da ingestão total da dieta contendo a primeira dose de aplicação (hora zero). O experimento foi monitorado diariamente durante 20 dias, avaliando-se a mortalidade dos indivíduos e aparição de deformações morfológicas na larva ou na pupa. Em adição como parte da avaliação fenotípica, no décimo dia após a hora zero, foi medido o comprimento total de cada larva. Para análise estatística foi utilizado ANOVA *one way*, seguida do teste de comparação múltipla de Tukey (TSD). Além disto, as alterações morfológicas foram registradas por meio de imagem digital, usando a câmera digital da lupa Leica DFC310 FX (Leica Microsystems, Alemanha). O experimento foi realizado com três repetições.

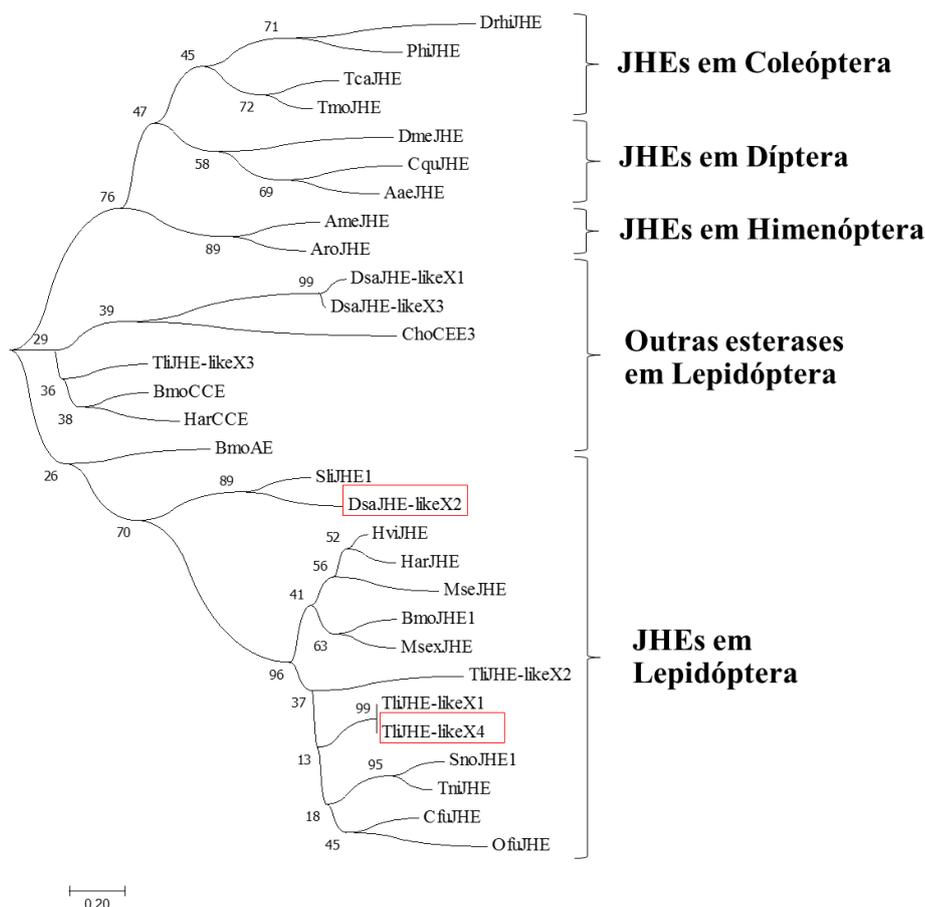
## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Identificação dos genes *jhe* nos transcritomas de *D. saccharalis* e *T. l. licus*

Foram identificadas três e quatro sequências *jhe-like*, nos transcritomas de intestino de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, respectivamente. Nenhuma das sequências apresentou ORF completa. Entretanto, foi possível classificar os genes por meio da reconstrução filogenética, usando as sequências proteicas parciais dos transcritos identificados. A árvore filogenética apresentou cinco grupos monofiléticos: JHEs de lepidópteros, JHEs de coleópteros, JHEs de himenópteros, JHEs de dípteros e outras esterases (não específicas para o JH) descritas em lepidópteros (Figura 19).

Com base na análise filogenética, observou-se que apenas um dos transcritos identificados no transcritoma de *D. saccharalis* agrupou-se no clado das JHEs de lepidópteros. Em contrapartida, três dos quatro transcritos identificados no transcritoma de *T. l. licus* foram identificadas como JHEs específicas de lepidópteros. Devido à inexistência de um genoma de referência para a broca-gigante, não foi possível afirmar se os transcritos identificados como JHEs em *T. l. licus*, são produtos de duplicação gênica ou isoformas de genes não monofiléticos. Contudo, o grau de similaridade entre as sequências sugere que as sequências TIJHE-likeX4 e TIJHE-likeX1 sejam produtos de duplicação de genes, entanto a sequência TIJHE-likeX2 poderia ser não monofilética.

Um modelo para a duplicação gênica da JHE em Lepidoptera foi reportado recentemente por Kontogiannatos *et al.* (2016), propondo uma duplicação inicial do gene *jhe* por splicing alternativo e a posterior duplicação dessas duas cópias por meio de grandes deleções, produzindo isoformas menores do gene. Um aspecto importante do fenômeno de multiplicação gênica, é a expressão diferencial de algumas dessas isoformas nos estádios finais da fase larval. A expressão diferenciada das isoformas do gene *jhe* pode estar relacionada com um modelo de regulação do JH, ainda mais elaborado do que o conhecido atualmente. Porém, para se entender melhor o mecanismo de degradação do JH, é necessário identificar a presença de outras isoformas do JHE, nos genomas de outros lepidópteros, e validar sua expressão e função em diferentes fases de desenvolvimento do inseto.

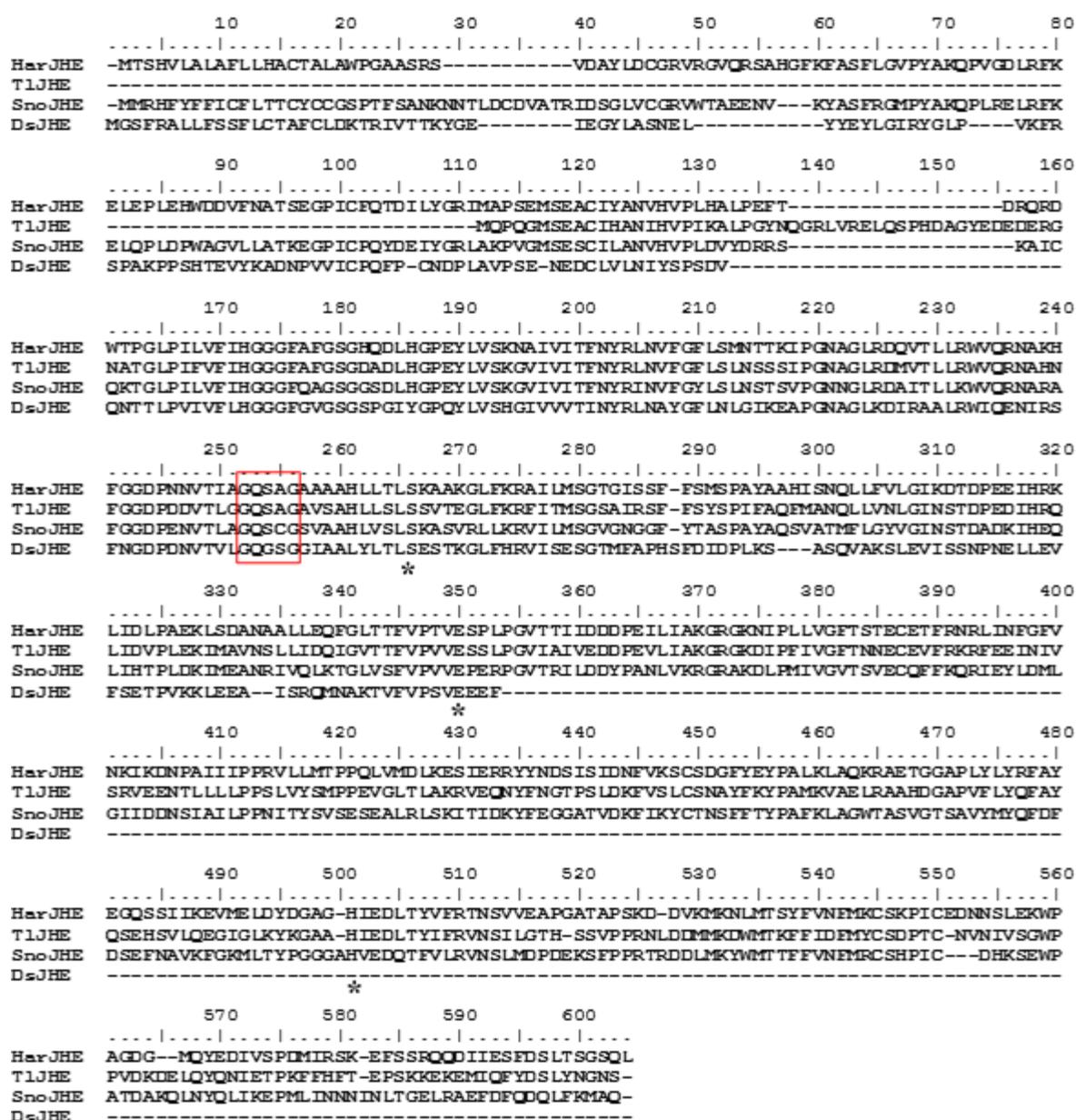


**Figura 19.** Árvore filogenética construída usando o algoritmo Neighbor-Joining, das esterases do hormônio juvenil (JHEs) descritas em Lepidoptera e em outros insetos, além de outras esterases descritas em lepidópteros. Os transcritos similares a JHEs identificados nos transcritomas do intestino de *D. saccharalis* e *T. l. licus* estão representados pelas abreviaturas DsaJHE-like e TliJHE-like respectivamente. As caixas vermelhas indicam os genes selecionados para validação por RNAi. As abreviaturas das demais sequências com seu respectivo número de acesso e o nome completo da espécie, são as seguintes: SnoJHE1, ABW24129.1 (*Sesamia nonagrioides*); TniJHE, Q7M4E5 (*Trichoplusia ni*); BmoJHE1, NP\_001037027.1 (*Bombyx mori*); MseJHE, AJR27471.1 (*Mythimna separata*); HviJHE, AAC38822.1 (*Heliothis virescens*); MsexJHE, AAG42021.2 (*Manduca sexta*); OfuJHE, OACB12192.1 (*Ostrinia fuscidentalis*); HarJHE, AEB77712.1 (*Helicoverpa armigera*); SliJHE1, XP\_022832867.1 (*Spodoptera litura*); CfuJHE, AAD34172.1 (*Choristoneura fumiferana*); DmeJHE, AAK07833.1 (*Drosophila melanogaster*); CquJHE XP\_001863697.1 (*Culex quinquefasciatus*); AaeJHE, AAEL005200-PA (*Aedes aegypti*); AmeJHE, AAU81605.1 (*Apis mellifera*); AroJHE, BAD91554.1 (*Athalia rosae*); TcaJHE, BAJ10679.1 (*Tribolium castaneum*); TmoJHE, AAL41023.1 (*Tenebrio molitor*); PhiJHE, BAE94685.1 (*Psacotheta hilaris*); DrhiJHE, ATS94112.1 (*Dendroctonus rhizophagus*); BmoCCE, BAI66485.1 (*Bombyx mori*); HarCCE, ADF43475.1 (*Helicoverpa armigera*); BmoAE, NP\_001104822.1 (*Bombyx mori*); ChoCEE3, ACR56068.1 (*Cochliomyia hominivorax*). CCE: Família das Carboxil-coline-esterases. AE: Alfa esterase. CEE3: Carboxil-esterase E3.

No presente trabalho, foi caracterizada a expressão e possível função de uma das isoformas do JHE. Para *D. saccharalis* foi escolhida a sequência DsaJHE-likeX2, a qual apresentou homologia com outras JHEs em lepidópteros. A ORF desta sequência está constituída por 885 pb que codificam para uma proteína parcial de 295 aminoácidos. Para fins práticos esta sequência foi aqui renomeada para *Dsjhe*. Da mesma forma, para *T. l. licus* foi selecionada a sequência TliJHE-like X4, a qual apresentou a ORF mais completa das três

sequências identificadas como JHE para esse inseto. A ORF de 1464 pb, codifica para uma proteína parcial de 487 aminoácidos. Esta sequência foi nomeada *Tljhe*. A sequência dos genes selecionados pode ser encontrada no anexo II.

As sequências de aminoácidos DsJHE e TIJHE foram alinhadas com as sequências da JHE previamente caracterizadas em *H. armigera* (Chikate *et al.*, 2016) e *S. nonagrioides* (Kontogiannatos *et al.*, 2013) (Figura 20).



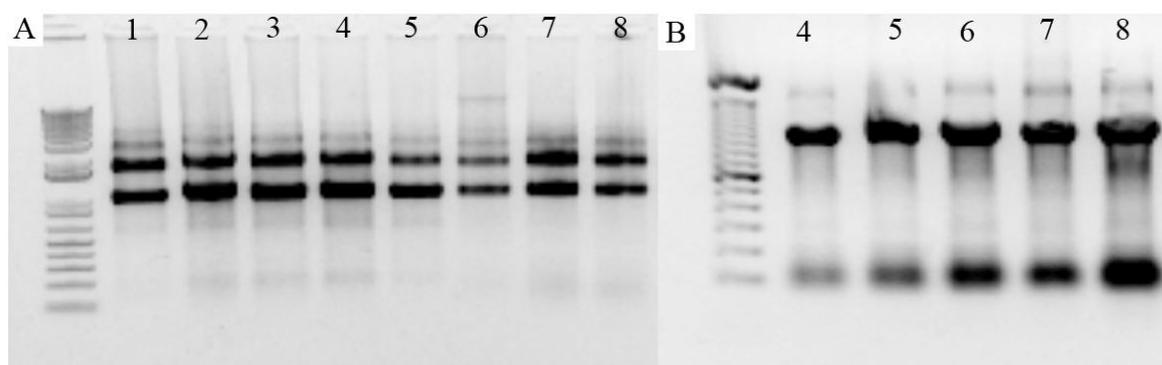
**Figura 20.** Alinhamento das sequências de aminoácidos das JHEs de *H. armigera* (HarJHE), *S. nonagrioides* (SnoJHE), *T. l. licus* (TIJHE) e *D. saccharalis* (DsJHE). O motivo GQxxG, conservado em todas as JHEs descritas em insetos, está indicado na caixa vermelha. Os asteriscos (\*) indicam os três resíduos da tríade catalítica (Ser-203, Glu-334, His-448), conservados na família das esterases.

A estrutura primária da JHE de *D. saccharalis* apresentou maior identidade com a JHE de *S. nonagrioides*. Entretanto, a sequência de *T. l. licus* teve maior identidade com a JHE de *H. armigera*. Na estrutura primária de DsJHE e TIJHE, foram identificados os dois motivos principais do sítio catalítico, conservados em todas as JHEs: a denominada tríade catalítica (Ser-203, Glu-334, His-448) e o motivo GQxxG situado nove aminoácidos antes da serina catalítica na posição 203 (Kamita *et al.*, 2003). A histidina na posição 448 não foi identificada na JHE de *D. saccharalis* devido à ausência da sequência na porção final.

Para fins de validação funcional dos genes *Dsjhe* e *Tljhe*, e avaliação do potencial para uso no controle da broca da cana e da broca-gigante por meio de RNAi, não foi necessário obter a sequência completa dos genes. A região da sequência obtida dos transcritomas contém a informação necessária para identificar os genes como JHEs e para desenhar as moléculas de dsRNA. Porém, visando a caracterização molecular completa dos genes que codificam a JHE nestes insetos, a obtenção da ORF completa deve ser prioridade em futuros experimentos, por meio de 3' 5' RACE (*Rapid amplification of cDNA ends*), para complementar os dados do presente trabalho.

#### 4.2 Extração de RNA

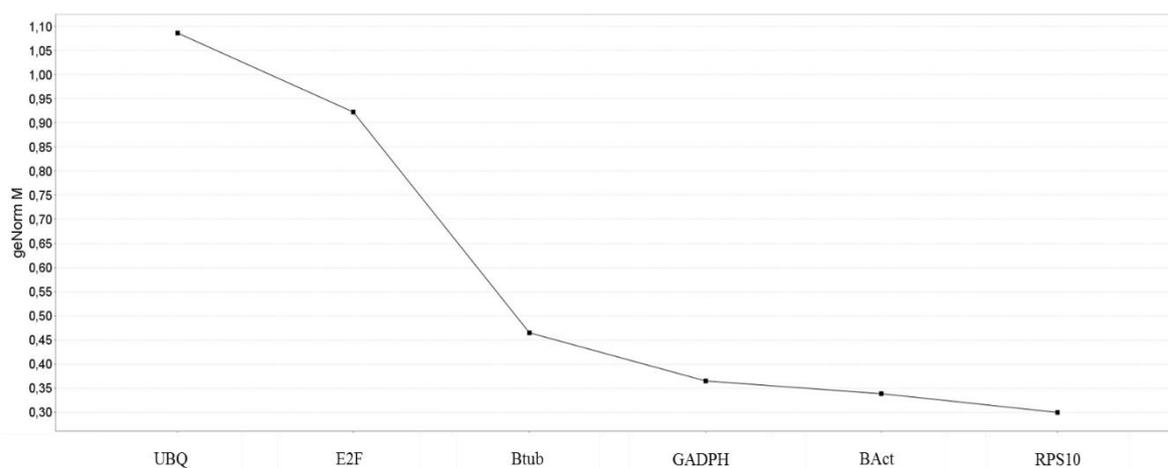
O RNA total extraído das diferentes fases de desenvolvimento de *D. saccharalis* e *T. l. licus* apresentou qualidade (Figura 21) e quantidade (>2 µg) suficientes para sintetizar os cDNAs. Em seguida, os cDNAs sintetizados foram utilizados nos testes para otimização dos *primers* e para a avaliação do perfil de expressão do gene *jhe*. Da mesma forma, o RNA total extraído de diferentes tecidos (carcaça e intestino) de larvas de penúltimo ínstar, foi extraído com sucesso, para posterior avaliação da expressão do gene *jhe* no intestino.



**Figura 21.** Resultado da eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando as amostras de RNA total extraído das diferentes fases de desenvolvimento de: A) *D. saccharalis* e B) *T. l. licus*. 1) Ovo. 2) Larva neonata. 3) Larva de terceiro ínstar. 4) Larva de penúltimo ínstar. 5) Larva de último ínstar. 6) Pré-pupa. 7) Pupa. 8) Adulto. Foi utilizado como marcador de peso molecular o 1Kb Plus Ladder (Invitrogen).

### 4.3 Análise de estabilidade para os genes de referência em *D. saccharalis*

A partir da análise de estabilidade realizada com o programa geNorm, foram selecionados os genes  $\beta$ -actina e *rps10* como genes de referência para todos os experimentos de qRT-PCR realizados em *D. saccharalis*. Esses dois genes apresentaram um valor de M menor que 0,5 (Figura 22), que segundo (Vandesompele *et al.*, 2002) indica os valores ótimos ( $M \leq 0,5$ ) de estabilidade para experimentos de qRT-PCR.



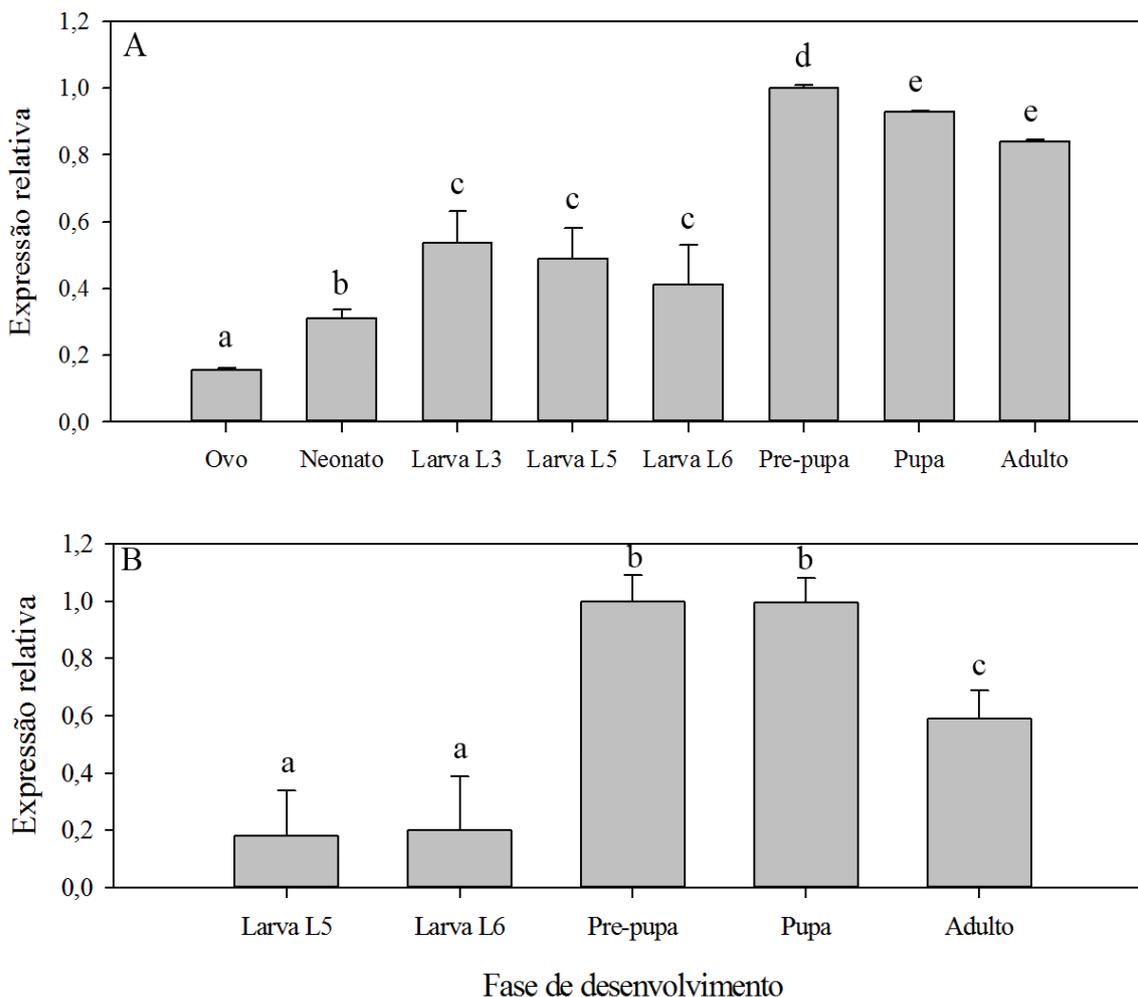
**Figura 22.** Resultado do geNorm mostrando o índice de estabilidade M dos genes de referência avaliados em *D. saccharalis*. *UBQ*: Ubiquitina. *E2F*: fator de elongação II. *btub*:  $\beta$ -tubulina. *GADPH*: Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase. *Act*:  $\beta$ -Actina. *RPS10*: Proteína ribossomal S10.

Em estudos prévios foram avaliados satisfatoriamente os genes de referência *rps18* (proteína ribossomal S18) e *GADPH*, em experimentos de RNAi e expressão diferencial de genes no intestino de *D. saccharalis*. (Yang *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). Contudo, até o momento não existe publicação mostrando uma análise de estabilidade gênica usando mais de dois genes de referência testados em diferentes condições experimentais. Assim, os dados gerados em nosso estudo, além de contribuir para a expansão do banco de dados de genes de referência para *D. saccharalis*, permitiram o desenho experimental de RNAi com alta confiabilidade para aplicação na avaliação da expressão gênica por qRT-PCR.

### 4.4 Determinação do perfil de expressão do gene *jhe*

O perfil de expressão do gene *jhe* em diferentes fases de desenvolvimento de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, exibiu resultados similares. A partir dos oito estágios de desenvolvimento avaliados em *D. saccharalis*, foram formados cinco grupos significativamente diferentes (Valor  $P < 0,05$ . TS test) entre si (Figura 23A). A expressão máxima do gene foi observada na fase de pré-pupa. As fases de pupa e adulto exibiram uma leve diminuição da

expressão em relação à pré-pupa, formando o segundo grupo. O terceiro grupo foi formado por três dos quatro ínstares larvais avaliados. Larvas de terceiro, penúltimo e último ínstar não apresentaram diferenças significativas entre eles, mas encontraram-se menos expressos do que as fases posteriores do ciclo de vida do inseto. Finalmente, as fases de neonato e de ovo formaram os últimos dois grupos, sendo a fase de ovo na qual foi detectado o mínimo valor de expressão.



**Figura 23.** Perfil de expressão do gene *jhe* nos diferentes estágios de desenvolvimento de: A) *D. saccharalis* e B) *T. l. licus*. As letras acima das barras representam os diferentes grupos com diferenças estatisticamente significativas entre si (Valor  $P < 0,05$ ; TS test). L3: Larva de terceiro ínstar. L5: Larva de penúltimo ínstar. L6: Larva de último ínstar. O valor de expressão relativa 1 corresponde ao 100% de expressão do gene.

De forma similar com o visto nas análises de expressão em *D. saccharalis*, no perfil de expressão do gene *Tljhe* em *T. l. licus* foram observados três grupos com diferenças significativas (Valor  $P < 0,05$ . TS test) entre si (Figura 23B). As fases de pupa e pré-pupa formaram o primeiro grupo, com o maior valor de expressão do gene *Tljhe*. O segundo grupo foi formado pela fase de adulto, e o terceiro grupo formado pelas duas últimas fases larvais, que

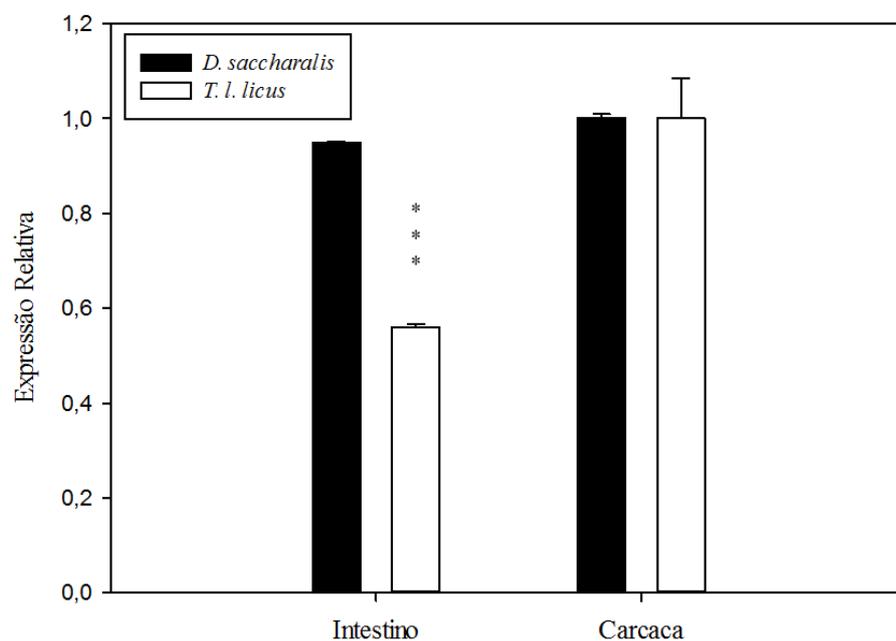
apresentaram o menor valor de expressão. De forma geral, observou-se um padrão no perfil de expressão do *jhe* nos dois insetos, caracterizado por um aumento na transcrição do gene conforme o ciclo de vida do inseto avança. Este resultado está em concordância com o reportado sobre os níveis do JH ao longo do ciclo de vida dos insetos, uma vez que os níveis de JHE são, em teoria, inversamente proporcionais aos níveis de JH (Cheong *et al.*, 2015).

Perfis de expressão diferentes aos observados neste trabalho foram descritos anteriormente em outros lepidópteros como *H. armigera* (Vatanparast *et al.*, 2017) e *Plutella xylostella* (Gu *et al.*, 2015). Em *H. armigera*, o padrão de expressão do gene *jhe* nos últimos três instares larvais é similar ao observado na fase de pupa, enquanto que para ovos, duas primeiras fases larvais e adultos, a expressão do gene foi menor. Por outro lado, em *P. xylostella*, a maior expressão foi observada no quarto instar larval, enquanto que nas outras fases do ciclo de vida, o gene *jhe* foi encontrado regulado negativamente. Um padrão ainda mais específico foi encontrado na mariposa *Adoxophyes honmai*, onde os níveis de expressão do gene *jhe* apresentam diferenças significativas inclusive em momentos diferentes de uma mesma fase larval (Saito *et al.*, 2015).

A variabilidade intraespecífica do gene *jhe* nas fases larvais dos lepidópteros foi rigorosamente estudada no bicho da seda por Cheng *et al.* (2014), avaliando a expressão de quatro cópias do gene *jhe*, em diferentes tempos do crescimento larval do inseto. Foram observadas grandes variações na expressão de duas cópias do gene, em função dos momentos específicos de jejum (pré-ecdise e pós-ecdise), assim como dos períodos intermédios de alimentação. Resultados similares foram observados em *S. nonagrioides*, que apresenta quatro cópias do gene *jhe*. Cada cópia apresenta um padrão de expressão diferente quando avaliado em diferentes dias dos últimos dois instares larvais (Kontogiannatos *et al.*, 2016).

Os padrões de expressão do gene *jhe*, observados em *D. saccharalis* e *T. l. licus*, podem estar relacionados com as variações intraespecíficas descritas anteriormente. Porém, é preciso primeiramente identificar e caracterizar as outras isoformas para tirar conclusões mais precisas sobre o perfil de expressão das cópias do gene *jhe* nos insetos estudados no presente trabalho. Contudo, podemos inferir que a máxima expressão observada nas fases de jejum (pupa e pré-pupa) da broca da cana e a broca-gigante, pode ser devido à participação do JHE na degradação do JH, como parte da preparação do inseto para iniciar a metamorfose.

O perfil de expressão também foi avaliado para os tecidos intestino e carcaça em larvas de penúltimo ínstar. Somente o gene *Tljhe* de *T. l. licus* apresentou diferenças significativas, encontrando-se levemente sub-expresso no intestino. Diferentemente, o gene *Dsjhe* de *D. saccharalis* não apresentou diferenças significativas entre os dois tecidos (Figura 24). Segundo o reportado em outros insetos, o gene *jhe* é expresso principalmente nos corpos gordurosos (Bai *et al.*, 2007; Mackert *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2015). Porém, trabalhos mais recentes têm demonstrado expressão do gene *jhe* no intestino de alguns lepidópteros (Cheng *et al.*, 2014; Vatanparast *et al.*, 2017).



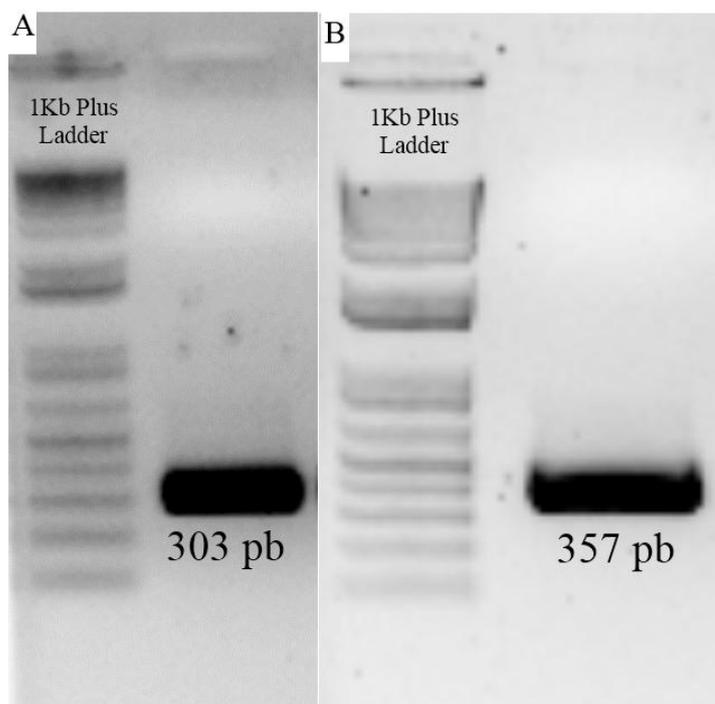
**Figura 24.** Expressão do gene *jhe* no intestino de *D. saccharalis* e *T. l. licus*, em referência à carcaça. Os asteriscos (\*\*\*) representam o nível de significância estatística (Valor  $P < 0,001$ . TS test) entre as amostras de intestino e carcaça de *T. l. licus*. O valor de expressão relativa 1 corresponde ao 100% de expressão do gene.

Embora a produção do hormônio juvenil esteja restrita ao cérebro, recentemente foi comprovado que a atividade deste hormônio pode ter um papel regulatório em tecidos específicos. Em *D. melanogaster*, a atividade localizada do JH nas células do intestino, regula os processos de crescimento e diferenciação celular (Rahman *et al.*, 2017). Da mesma forma, as enzimas que regulam as concentrações do JH no organismo, podem ser expressas de forma localizada. Destaca-se o estudo realizado em *B. mori* por Cheng *et al.* (2014), no qual foi encontrada uma cópia do gene *jhe* expressando-se especificamente em intestino e túbulos de Malpighi. Este tipo de fenômeno geralmente conduz a uma especialização funcional das diferentes isoformas de um determinado gene. No caso das JHEs em lepidópteros, a presença de variantes do JH pode ter impulsionado a diversificação dos genes *jhe* e seus consequentes padrões de expressão localizada (Noriega, 2014).

No presente estudo, de acordo com o resultado obtido para o perfil de expressão do gene *jhe* em função do tecido, podemos concluir que os genes *Dsjhe* e *Tljhe* não são expressos de forma específica no intestino. Visando a supressão destes genes por RNAi, o aspecto mencionado é importante porque o efeito de silenciamento pode ser avaliado de forma localizada (nas células do intestino) e sistêmica (no indivíduo inteiro).

#### 4.5 Síntese *in vitro* das moléculas de dsRNA

Duas sequências de dsRNA foram desenhadas por meio de estudo *in silico*, uma para o gene *Tljhe* (dsTljhe) com um tamanho total de 303 pb (Figura 25A), e outra para o gene *Dsjhe* (dsDsjhe) com um tamanho total de 357 pb (Figura 25B). As sequências dsDsjhe e dsTljhe foram desenhadas próximas à região não traduzida 3' (Anexo II), que representa a região menos conservada do gene *jhe* em insetos, oferecendo maior especificidade para desenhar moléculas de dsRNA (Kamita *et al.*, 2003). Posteriormente, a probabilidade de efeito não alvo na cana-de-açúcar ou em outros insetos foi avaliada, sendo preditos 53 e 79 possíveis siRNAs, a partir das sequências dsDsjhe e dsTljhe, respectivamente. Não foram identificados genes alvos com complementaridade total aos siRNAs preditos das duas sequências. Após a confirmação da clonagem por PCR e sequenciamento do produto purificado, foram sintetizadas e purificadas *in vitro* as moléculas de dsRNA.

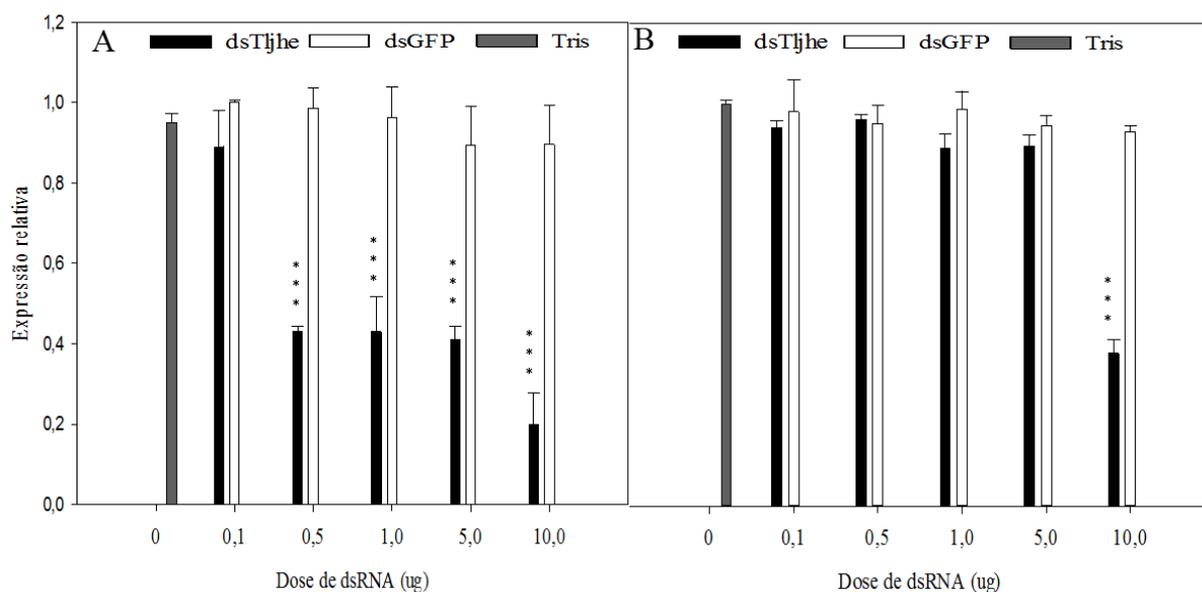


**Figura 25.** Resultado da eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando os fragmentos purificados de dsRNA, sintetizados *in vitro* para serem usados nos bioensaios com *D. saccharalis* e *T. l. licus*. A) dsTljhe. B) dsDsjhe. O rendimento médio da expressão *in vitro* das moléculas de dsRNA foi de 80 µg por reação.

## 4.6 Bioensaios em *D. saccharalis* e *T. licus licus*

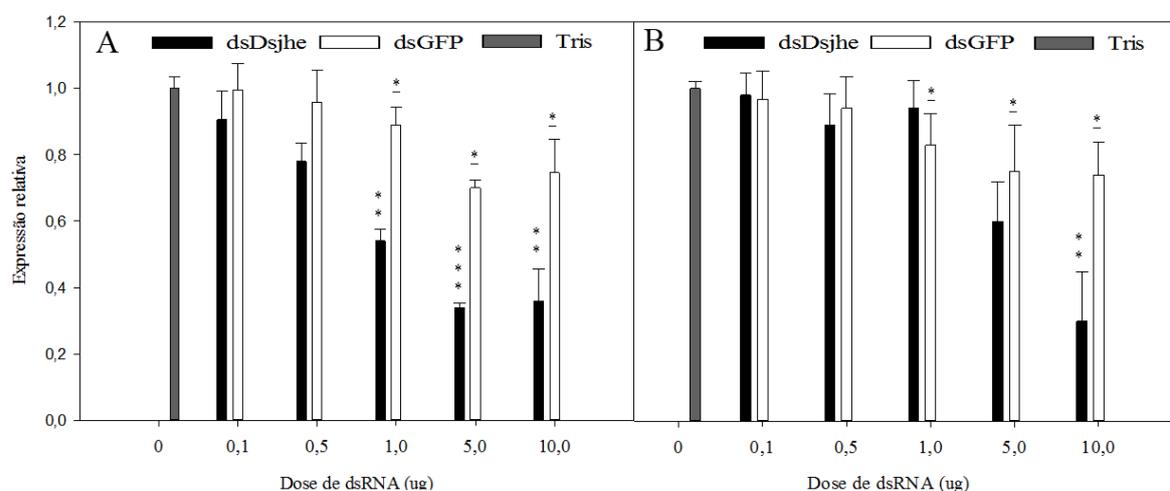
### 4.6.1 Determinação da quantidade ótima de dsRNA

Inicialmente, foram realizados bioensaios com a finalidade de conhecer o efeito de diferentes quantidades de dsRNA sobre a expressão do gene *jhe* em *D. saccharalis* e *T. l. licus*, usando os métodos de entrega por via oral e por microinjeção. O efeito de silenciamento foi considerando quando houve regulação negativa da expressão do gene *jhe* nos insetos tratados com dsTljhe ou dsDsjhe, em relação aos insetos tratados com dsGFP (controle negativo). O efeito do silenciamento em *T. l. licus*, considerando a administração de diferentes quantidades de dsTljhe, foi significativamente maior com o método de entrega oral, em comparação com o método de microinjeção. Das cinco quantidades de dsTljhe testadas por entrega oral, os tratamentos com 0,5 µg, 1 µg, 5 µg e 10µg induziram a diminuição da expressão do gene *Tljhe* (Figura 26A). Nos insetos microinjetados, só foi observado efeito de silenciamento do gene *Tljhe* com 10 µg de dsTljhe (Figura 26B). No tratamento com moléculas de dsGFP não foram observadas diferenças significativas em referência ao tratamento controle com Tris 10mM (pH 8,0), tanto para a entrega oral quanto para a microinjeção. Desta forma, concluiu-se que a administração de dsGFP não interfere com a expressão endógena do gene *Tljhe*, portanto, a molécula de dsGFP foi considerada apropriada para nosso desenho experimental.



**Figura 26.** Expressão relativa do gene *jhe* de *T. l. licus*, em resposta à administração de moléculas de dsRNA por meio de: A) Entrega oral e B) Microinjeção. Os asteriscos (\*\*\*) representam o nível de significância estatística (Valor P < 0,001; TS test), entre as amostras de insetos tratados com dsTljhe e as amostras controle tratadas com dsGFP, para cada dose de dsRNA respectivamente. Nenhum dos insetos tratados com as diferentes doses de dsGFP apresentou diferenças significativas em relação aos insetos controle, tratados com Tris 10mM (pH 8,0). O valor de expressão relativa 1 corresponde ao 100% de expressão do gene.

Nos bioensaios com *D. saccharalis*, observou-se efeito de silenciamento usando 1 µg, 5 µg e 10 µg de dsDs $jhe$ , entregue por via oral (Figura 27A). Por outro lado, no tratamento por microinjeção, somente com 10 µg de dsDs $jhe$  foi observada diminuição da expressão do gene *Ds $jhe$*  (Figura 27B). Porém, para as duas formas de entrega do dsRNA, também foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com 1 µg, 5 µg e 10 µg de dsGFP, em relação aos indivíduos controle com Tris 10mM. Ou seja, as moléculas de dsGFP, em determinadas concentrações, alteram a expressão do gene *jhe* de *D. saccharalis*, dificultando, mas não impossibilitando a interpretação dos resultados de qRT-PCR.



**Figura 27.** Expressão relativa do gene *jhe* de *D. saccharalis*, em resposta à administração de moléculas de dsRNA por meio de: A) Entrega oral e B) Microinjeção. Os asteriscos (\*) representam o nível de significância estatística (\*\*: Valor  $P < 0,01$ , \*\*\*: Valor  $P < 0,001$ ; TS test), entre as amostras de insetos tratados com dsDs $jhe$  e as amostras controle tratadas com dsGFP, para cada dose de dsRNA respectivamente. Os asteriscos sublinhados (\*) indicam diferenças significativas entre as amostras dos indivíduos tratados com uma determinada dose de dsGFP, e os indivíduos controle tratados com Tris 10mM (pH 8,0). O valor de expressão relativa 1 corresponde ao 100% de expressão do gene.

O efeito de moléculas de dsRNA sobre genes não alvo tem sido comprovando em insetos, embora as possíveis causas, continuam sendo motivo de discussão. Uma das hipóteses é que a resposta imune a moléculas de dsRNA podem regular a expressão de genes envolvidos em diferentes processos das células (Nunes *et al.*, 2013). Provavelmente, o efeito observado em *D. saccharalis* não foi igualmente observado em *T. l. licus* devido a razão entre quantidades de dsRNA administrado e o peso do indivíduo, sendo maior para broca-da-cana.

Para *T. l. licus*, a maior porcentagem de redução relativa de expressão (PRR) foi observada usando 10 µg de dsTl $jhe$ , administrada por via oral ( $77,6\% \pm 6,6$ ). As quantidades 0,5 µg, 1 µg e 5 µg dsTl $jhe$  entregue por via oral e 10 µg aplicadas por microinjeção, não apresentaram diferenças significativas entre si, mostrando uma PRR de  $55\% \pm 4,3$ . Finalmente, não foi observado efeito de silenciamento (PRR=0%) usando as quantidades 0,1 µg de dsTl $jhe$

administrado por via oral, e 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg e 5 µg aplicadas por microinjeção. Nas análises estatísticas realizadas para *D. saccharalis* foram observados quatro grupos com diferenças significativas. O primeiro grupo, com os valores mais altos de PRR (55,5% ± 4,4), foi formado pelos tratamentos: 10 µg de dsDsjhe aplicadas por microinjeção e 5 µg e 10 µg aplicadas por entrega oral. O segundo e o terceiro grupo foram formados pelas quantidades de dsDsjhe 1 µg (39,8% ± 4,1) e 0,5 µg (18,6% ± 5,6) respectivamente, as duas administradas por via oral. O grupo composto pelos demais tratamentos, 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg e 5 µg de dsDsjhe aplicadas por microinjeção e 0,1 µg administrados por via oral, apresentou um PRR de 0%.

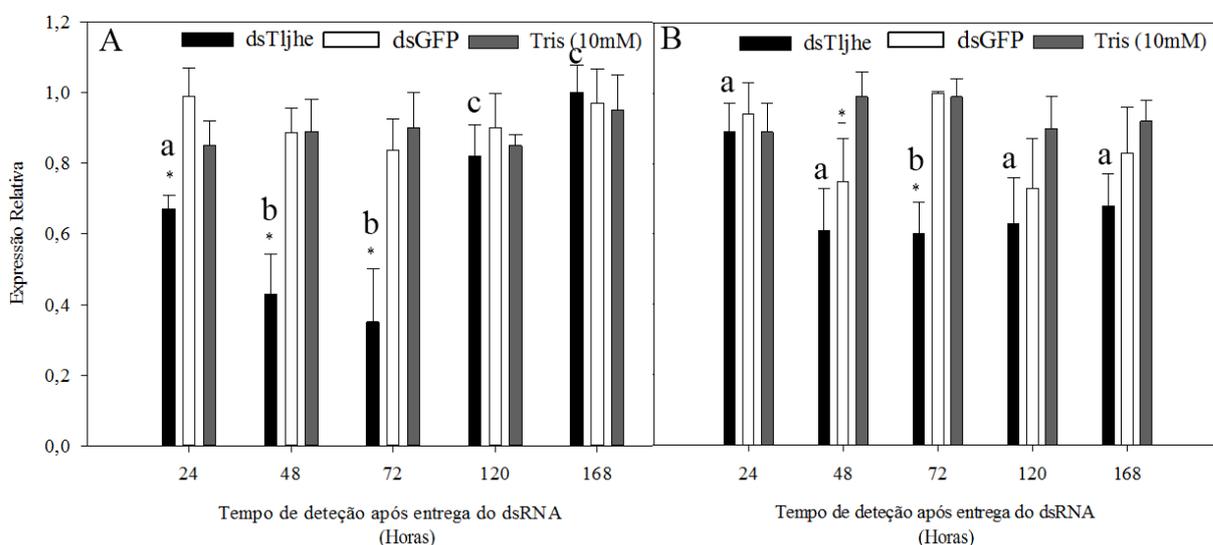
De modo geral, para os bioensaios com os dois insetos, observou-se que o método de entrega por microinjeção é menos eficiente que o de entrega via oral, visto que neste último método foi observada redução da expressão do gene *jhe* a partir 0,5 µg, enquanto que pelo método de microinjeção só a maior quantidade produziu o mesmo efeito. Ademais, o efeito de silenciamento observado por microinjeção utilizando 10 µg pode não refletir um efeito direto do dsRNA específico para *jhe*. Isto deve-se a que concentrações muito altas (>6 µg/µl) de dsRNA microinjetado diretamente na hemolinfa do inseto, pode gerar respostas celulares que afetem indiretamente a expressão de mais de um gene (Scott *et al.*, 2013).

Os resultados reportados neste estudo contradizem o demonstrado historicamente em Lepidoptera, ordem na qual o silenciamento por administração oral das moléculas de dsRNA tem se mostrado menos eficiente que o silenciamento por microinjeção (Terenius *et al.*, 2011). Porém, como será discutido posteriormente neste trabalho, baseados no efeito fenotípico e comportamental exibidos em larvas de *T. l. licus*, esta aparente resposta de RNAi sistêmico a partir da ingestão de moléculas de dsRNA pode estar associado a um efeito indireto do efeito de silenciamento localizado no sistema digestivo do inseto. Contudo, é importante destacar que foram necessárias quantidades muito altas para se observar uma resposta de silenciamento nas duas espécies. A resposta diferencial da eficiência do RNAi entre lepidópteros e outras ordens de insetos, em função da quantidade de dsRNA administrada, é um fato bem descrito na literatura (Terenius *et al.*, 2011). Estudos recentes, avaliando a resposta de silenciamento em insetos não lepidópteros, reportaram alta eficiência de RNAi usando quantidades entre 50 ng e 1000 ng, alvejando genes relacionados com o hormônio juvenil (Fu *et al.*, 2016; Gujar e Palli, 2016; Lu *et al.*, 2016; Dominguez e Maestro, 2017). Por outro lado, doses aplicadas por microinjeção, entre 5 µg e 15 µg, foram necessárias para reduzir por RNAi a expressão do gene *jhe* em lepidópteros (Kontogiannatos *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2015).

Em bioensaios realizados por meio de entrega oral do dsRNA em dietas artificiais, foram necessárias concentrações de até  $60 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  (dsRNA/dieta) para observar uma diminuição significativa do número de transcritos do gene alvo (Lim *et al.*, 2016; Vatanparast *et al.*, 2017). Nesses dois trabalhos, avaliando a resposta de silenciamento em larvas de *H. armigera*, foi reportada 72 horas após a ingestão do dsRNA, uma porcentagem de redução da expressão do gene *jhe* variando entre 23% e 60%. No trabalho publicado por (Vatanparast *et al.*, 2017), foi testada além da entrega oral do dsRNA, a entrega por microinjeção, a qual gerou uma supressão do *jhe* de até 75%, quando microinjetando  $10 \mu\text{g}$  de dsRNA.

#### 4.6.2 Determinação do tempo de persistência do efeito de RNAi

Considerando a ausência de eficiência do RNAi ativado por microinjeção, o tempo de persistência do efeito de silenciamento foi avaliado somente nos insetos tratados com entrega oral das moléculas de dsRNA. As larvas de *T. l. licus* tratadas com  $1 \mu\text{g}$  de dsTljhe apresentaram diferenças significativas em relação às larvas tratadas com  $1 \mu\text{g}$  de dsGFP, somente 24, 48 e 72 horas após a ingestão total do dsRNA (Figura 28A). Por outro lado, as larvas de *D. saccharalis* tratadas com as mesmas quantidades de dsDs<sub>j</sub>he, só apresentaram diferenças significativas em relação às larvas tratadas com dsGFP 72 horas após a ingestão total do dsRNA (Figura 28B).



**Figura 28.** Expressão relativa do gene *jhe* em diferentes tempos após a entrega oral de moléculas de dsRNA. A) *T. l. licus* e B) *D. saccharalis*. Os asteriscos (\*) representam o nível de significância estatística (Valor  $P < 0,05$ ; TS test) entre as amostras de insetos tratados com dsDs<sub>j</sub>he ou dsTljhe, e as amostras controle tratadas com dsGPF, para cada tempo de detecção respectivamente. Os asteriscos sublinhados (\*) indicam diferenças significativas entre as amostras dos organismos tratados com dsGFP, e as larvas controle tratadas com Tris 10mM (pH 8,0). As letras representam os grupos que apresentaram diferenças significativas (Valor  $P < 0,05$ ; ANOVA e TSD) entre si, nos diferentes tempos de detecção após a entrega das moléculas de dsTljhe ou dsDs<sub>j</sub>he. O valor de expressão relativa 1 corresponde ao 100% de expressão do gene.

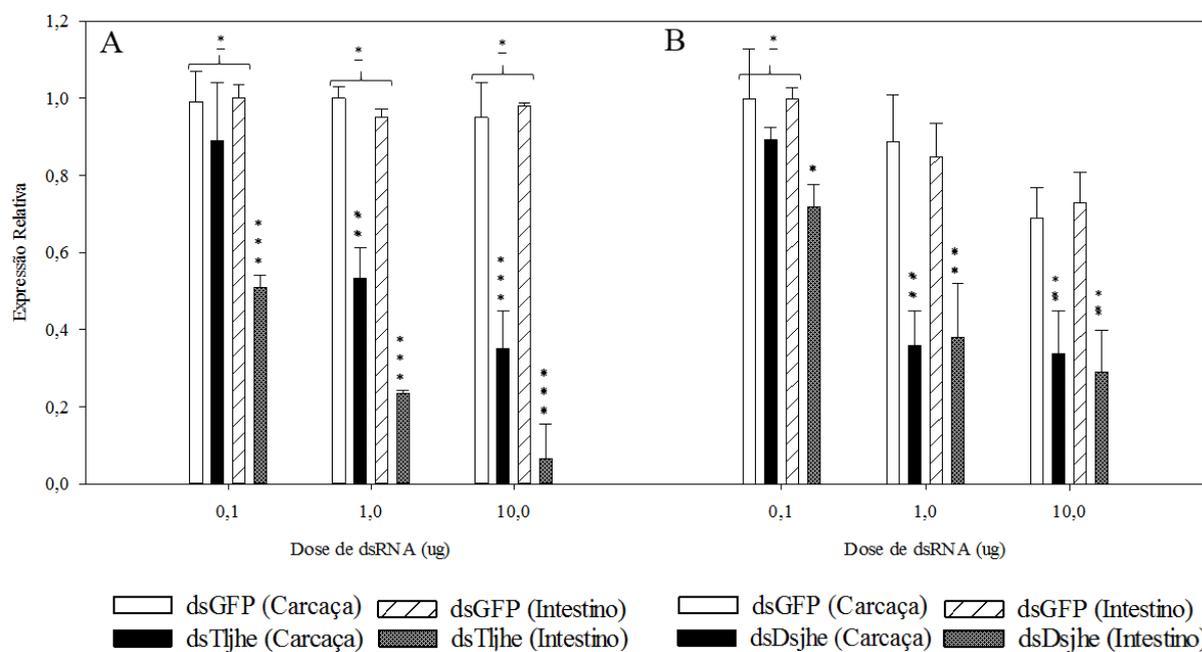
Do mesmo modo que foi mostrado na avaliação da dose ótima de dsRNA, podemos observar uma eficiência maior de silenciamento do gene *jhe* em *T. l. licus* do que em *D. saccharalis*. Em *T. l. licus*, a máxima redução da expressão do gene *jhe* foi observada 48 h e 72 h após a ingestão do dsRNA. Assim, esses foram determinados como os tempos ótimos de silenciamento. Em contrapartida, não foi possível determinar os tempos ótimos de silenciamento para *D. saccharalis*, uma vez que não foi observado efeito de silenciamento em mais de um tempo de detecção.

Finalmente, um aspecto importante para se destacar, é a baixa persistência do efeito de silenciamento nos dois insetos, o qual desaparece cinco dias após a ingestão total das moléculas de dsRNA, quando administrada uma dose única de 1 µg. A curta persistência do efeito de silenciamento em insetos está bem descrita atualmente, causado principalmente por ausência de amplificação do sinal de RNAi por meio de RdRP, assim como a escassa resposta de RNAi sistêmico exibida em alguns insetos (Coleman *et al.*, 2014; Joga *et al.*, 2016). Além desses fatores, foi proposto recentemente que a persistência do efeito de RNAi em insetos da ordem Lepidoptera pode ser fortemente diminuída pela interação entre a maquinaria de RNAi e vírus de RNA que infectam habitualmente este tipo de insetos (Swevers *et al.*, 2016). Por causa disso é comum observar nos estudos descritos aplicações de mais de uma dose de dsRNA, visando observar uma resposta fenotípica associada ao silenciamento de um determinado gene em insetos da ordem Lepidoptera (Lim *et al.*, 2016).

#### 4.6.3 Determinação da resposta localizada de silenciamento

Como foi mencionado anteriormente neste trabalho, o RNAi sistêmico é menos robusto em Lepidoptera do que em outros insetos (Shukla *et al.*, 2016). Neste contexto, no presente estudo foram comparadas as eficiências do efeito de RNAi de forma localizada (intestino) e de forma sistêmica (carcaça), em larvas de penúltimo ínstar de *D. saccharalis* e de *T. l. licus*, tratadas com a entrega oral do dsRNA. Para *T. l. licus*, a expressão relativa do gene *jhe* apresentou-se significativamente diferente entre amostras de carcaça e de intestino tratadas com todas as concentrações de dsTljhe utilizada (Figura 29A). Destaca-se que nos insetos tratados com 0,1 µg/cm<sup>3</sup> de dsTljhe não foi observado silenciamento do gene *Tljhe* em carcaça, enquanto que no intestino foi observado redução da expressão de 49% ± 4,3. Com a concentração de 1 µg/cm<sup>3</sup> a PRR observada foi de 46,7% ± 6,7 na carcaça e 75,4% ± 2,5 no intestino. Finalmente, utilizando 10 µg/cm<sup>3</sup>, a PRR foi de 63,1% ± 7,2 na carcaça e 93,3% ± 8,9 no intestino. No entanto, no caso de *D. saccharalis*, foram observadas diferenças significativas apenas no

tratamento com 0,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  de dsDs*jhe*. Com esta concentração, foi observada diminuição da expressão do gene *Ds*jhe** apenas no intestino ( $28\% \pm 5,2$ ), entretanto, na carcaça não se obteve resposta de silenciamento. Para as concentrações 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  e 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  foi observada uma PRR  $56,4\% \pm 10,6$  tanto na carcaça quanto no intestino (Figura 29B).



**Figura 29.** Expressão relativa do gene *jhe* em intestino e carcaça, em resposta à administração oral de moléculas de dsRNA. A) *T. l. licus* e B) *D. saccharalis*. Os asteriscos representam o nível de significância estatística (\*: Valor  $P < 0,05$ , \*\*: Valor  $P < 0,01$ , \*\*\*: Valor  $P < 0,001$ ; TS test) entre as amostras de insetos tratados com dsDs*jhe* ou dsT*ljhe* e as amostras controle tratadas com dsGPF, para cada tecido e dose de dsRNA respectivamente. Os asteriscos sublinhados (\*) representam as doses que apresentaram diferenças significativas (Valor  $P < 0,05$ ; ANOVA e TSD) entre intestino e carcaça. O valor de expressão relativa 1 corresponde ao 100% de expressão do gene.

No caso de *T. l. licus*, sugere-se que a maior eficiência de silenciamento do gene *Tljhe*, observada no efeito localizado em comparação ao efeito sistêmico, poderia ser explicada por dois motivos: 1) A menor abundância de transcritos do gene *jhe* no intestino do que na carcaça. Desta forma, a proporção entre a quantidade de dsT*ljhe* ingerido e a quantidade de mRNA alvo será maior no intestino, produzindo um maior efeito do RNAi. Isso, assumindo uma relação direta entre a quantidade de dsRNA ingerido e o grau de redução dos transcritos. 2) Ausência de um processo de RNAi sistêmico robusto, causado pela degradação do dsRNA por meio de nucleases específicas da hemolinfa, ou então, pela deficiência de transporte intercelular das moléculas de dsRNA (Shukla *et al.*, 2016).

O efeito localizado do RNAi foi significativamente mais eficiente que o efeito sistêmico. As implicações desta resposta para a sobrevivência do inseto, como consequência da regulação negativa do gene *jhe*, serão discutidas adiante neste trabalho, com base nos resultados obtidos

do efeito fenotípico associado à aplicação de moléculas de dsTljhe. Por outro lado, no caso de *D. saccharalis*, o perfil de expressão do gene *Dsjhe* tratado com moléculas de dsDsjhe, foi igual para carcaça e intestino. Em adição, a falta de RNAi sistêmico poderia explicar melhor porque uma pequena concentração de dsRNA ( $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) ativa uma resposta de silenciamento no intestino, e ao mesmo tempo, não foi suficiente para garantir a redução da expressão do gene-alvo no indivíduo todo. Supõe-se que este efeito deveria ser observado utilizando-se concentrações maiores de dsRNA. Porém, os resultados obtidos neste estudo não confirmaram esta suposição.

#### 4.6.4 Avaliação do efeito fenotípico associado ao silenciamento do gene *jhe*

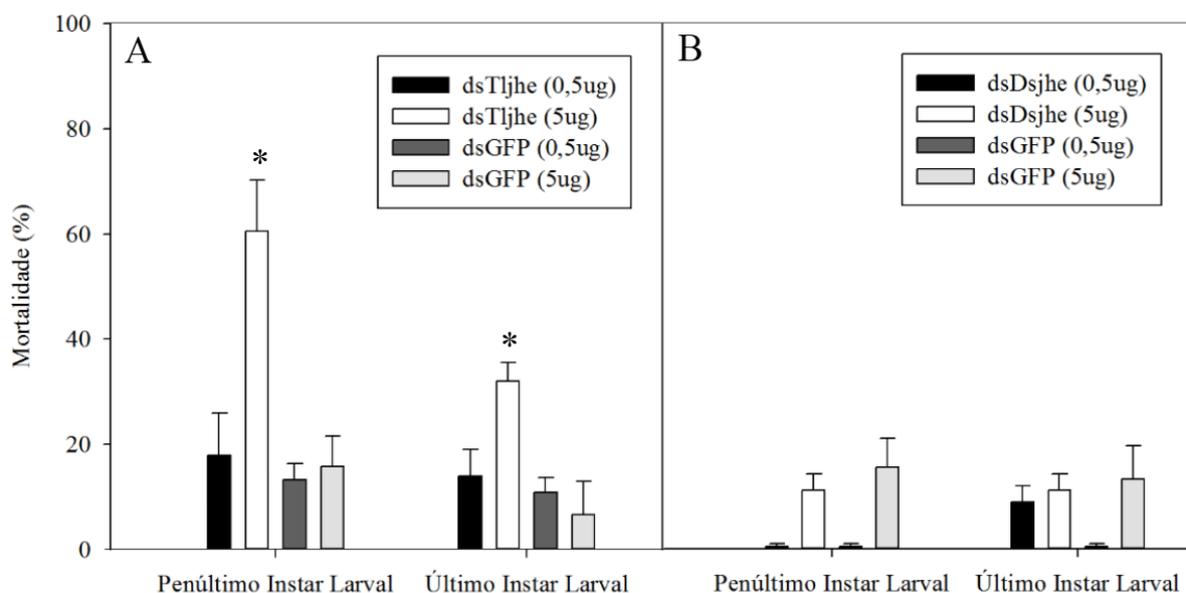
##### 4.6.4.1 Efeito de mortalidade

Com o objetivo de analisar o efeito fenotípico associado ao silenciamento do gene *jhe* em *T. l. licus* e *D. saccharalis*, foi realizado um bioensaio monitorado durante 20 dias, utilizando a metodologia de entrega oral das moléculas de dsRNA. Os experimentos foram conduzidos separadamente com larvas de penúltimo e último ínstar, visando observar como o silenciamento do gene poderia afetar nos processos de muda e metamorfose. As concentrações de dsRNA utilizadas foram  $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  e  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ . A aplicação do dsRNA foi feita em duas doses para tentar prorrogar o efeito do silenciamento acima do limite de persistência, observado a partir nas análises de tempo ótimo do efeito de silenciamento.

Com base nas médias da porcentagem de mortalidade máxima (PMM), foi observado que unicamente as larvas de penúltimo e último ínstar de *T. l. licus*, tratadas com a dose dupla de  $5 \mu\text{g}$  de dsTljhe, apresentaram diferenças significativas (Valor  $P < 0,05$ ; ANOVA e TSD) em relação ao controle. Larvas de penúltimo ínstar tratadas com dsTljhe apresentaram  $\text{PMM} = 60,5 \pm 8,8$ , e as larvas tratadas com dsGFP mostraram uma  $\text{PMM} = 15,8 \pm 5,8$ . Larvas de último ínstar tratadas com dsTljhe apresentaram  $\text{PMM} = 32,3 \pm 4,1$  e as larvas tratadas com dsGFP mostraram uma  $\text{PMM} = 6,6 \pm 3,9$  (Figura 30A). Em contrapartida, não foi observada mortalidade com significância estatística para os tratamentos realizados com *D. saccharalis* (Figura 30B) e, nem para as larvas de penúltimo e último ínstar de *T. l. licus* tratadas com a dose dupla de  $0,5 \mu\text{g}$  (Figura 30A).

Segundo o reportado na literatura, RNAi do gene *jhe* em outras espécies de lepidópteros, pela metodologia de microinjeção, apresentou médias de mortalidade entre 42% e 60% (Kontogiannatos *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2015; Vatanparast *et al.*, 2017). Por outro lado, pela

metodologia de entrega oral do dsRNA, até o momento só existem dados para *H. armigera*, onde em bioensaios com larvas de penúltimo ínstar, foram relatadas taxas de mortalidade de 87,5% (Chikate *et al.*, 2016) e 59% (Vatanparast *et al.*, 2017). Em ambos estudos foram aplicadas três doses (em intervalos de 24 horas) de 60 µg de dsRNA por centímetro quadrado de dieta.

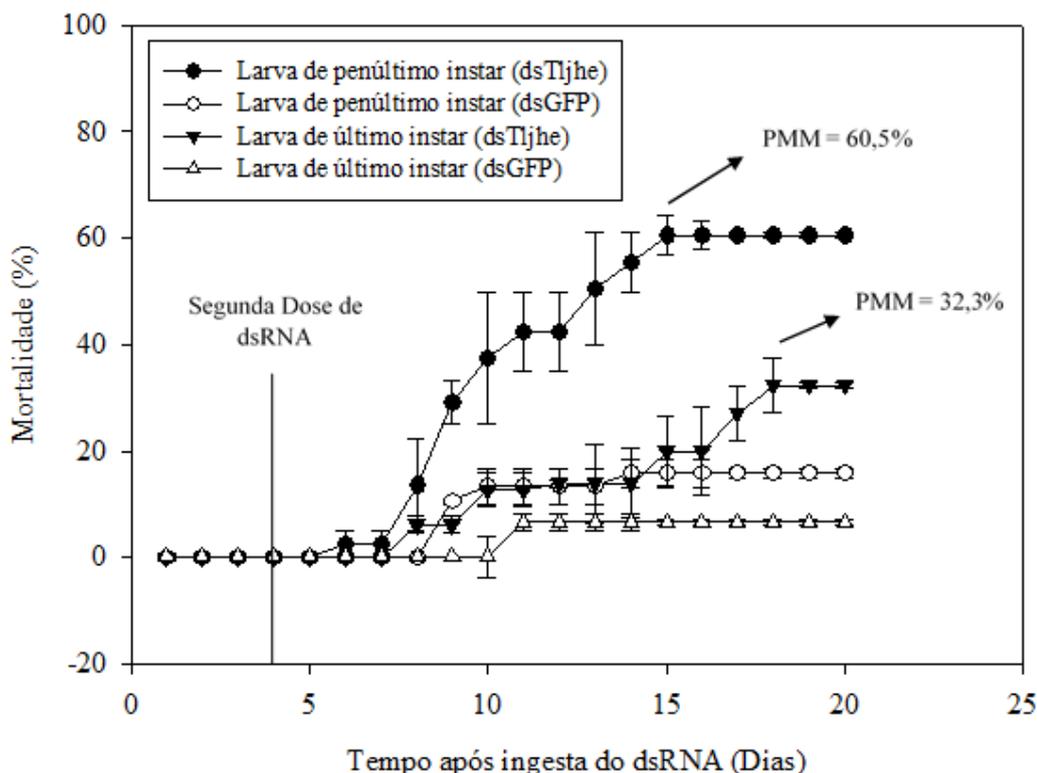


**Figura 30.** Porcentagem média de mortalidade máxima das larvas de penúltimo e último ínstar, tratadas com duas doses de diferentes quantidades de dsRNA administradas por via oral. A) *T. l. licus* e B) *D. saccharalis*. Os asteriscos (\*) representam os tratamentos com diferenças significativas (Valor P < 0,05; ANOVA e TSD), em comparação com seu respectivo controle com dsGFP.

No presente estudo foi observada para larvas de penúltimo ínstar de *T. l. licus*, mortalidade semelhante à observada por (Vatanparast *et al.*, 2017), porém, utilizando uma concentração 36 vezes menor de dsRNA dividida em duas aplicações. Em adição, observou-se que a mortalidade máxima foi atingida somente a partir de quinze dias após a ingestão da primeira dose de dsRNA (Figura 31). Diferentemente, nos trabalhos de Vatanparast *et al.* (2017) e Chikate *et al.* (2016), a mortalidade máxima foi reportada a partir dos dias 5 e 8 respectivamente. Nesses mesmos períodos, não foi observada mortalidade significativa nas larvas de penúltimo ínstar de *T. l. licus* tratadas com dsTljhe.

Uma observação importante é que mesmo com baixas porcentagens de supressão do gene *jhe* (<60%), é possível obter altas taxas de mortalidade (>80%). Isto indica que existe uma regulação muito eficiente do JH na presença da JHE, e que, pequenas mudanças de expressão do gene *jhe* podem desencadear efeitos fisiológicos letais para o inseto. Recentemente, foi demonstrado para duas espécies de lepidópteros (*Spodoptera spp*), que inibir levemente a

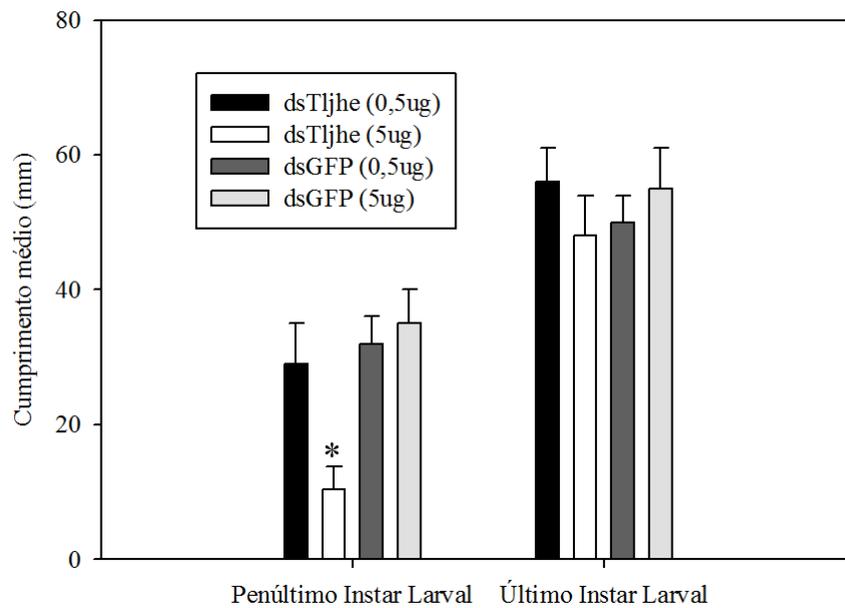
atividade da JHE por métodos químicos, conduz a altos índices de interrupção do desenvolvimento larval (El-Sheikh *et al.*, 2016). Desta forma, enfatiza-se que o gene estudado no presente trabalho se apresenta como um alvo promissor para controle de insetos-praga por meio de RNAi.



**Figura 31.** Porcentagem média de mortalidade ao longo dos vinte dias, para os bioensaios realizados usando duas aplicações (doses) de 5 µg de dsTljhe, administrados por via oral em larvas de penúltimo e último ínstar de *T. l. licus*. Na figura estão sinalizados com setas, os dias em que foi atingida a mortalidade máxima (PMM).

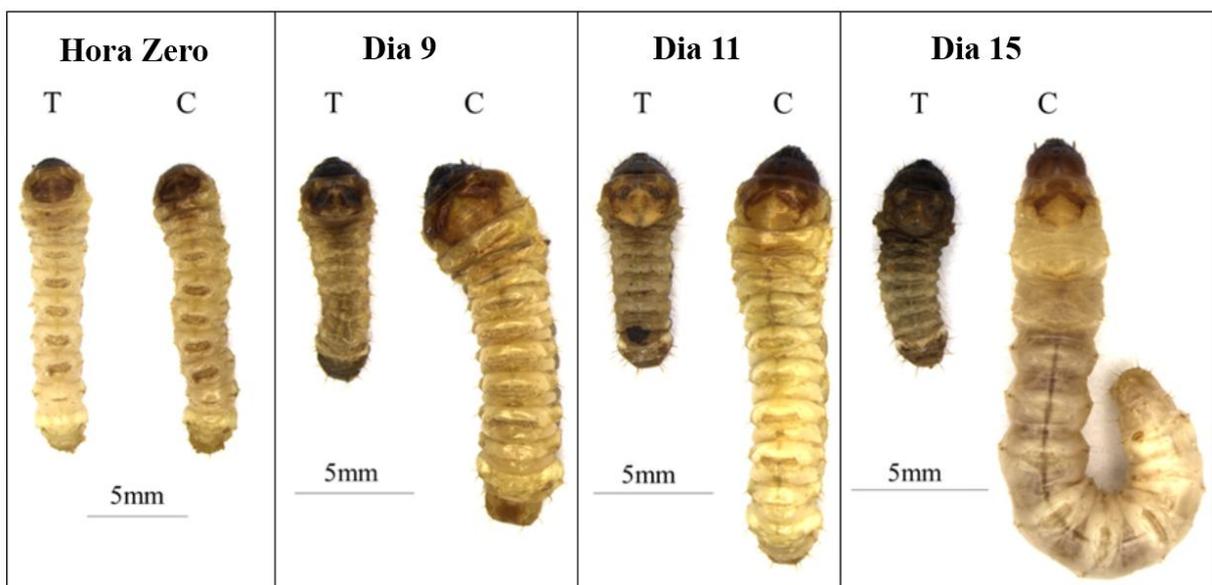
#### 4.6.4.2 Efeito do dsRNA no fenótipo dos insetos

O efeito fenotípico associado ao silenciamento do gene *jhe* foi observado somente em larvas penúltimo e último ínstar de *T. l. licus*, tratadas com a dose dupla de 5 µg de dsTljhe. Em contrapartida, as larvas de penúltimo e último ínstar de *D. saccharalis* não apresentaram alteração no fenótipo, associada ao silenciamento do gene *jhe*. O fenótipo de maior destaque foi observado quando avaliada a média do comprimento total (MCT) das larvas tratadas com dsTljhe em comparação às tratadas com dsGFP. É importante mencionar que a MCT foi calculada no dia 15 do experimento, exclusivamente nos indivíduos apresentando um efeito letal. As larvas de penúltimo ínstar de *T. l. licus* tratadas com dsTljhe, apresentaram redução significativa de tamanho (MCT= 10,4 mm ± 3,4), em relação às larvas tratadas com dsGFP (MCT= 35,0 mm ± 5,1) (Figura 32).



**Figura 32.** Média do comprimento total das larvas de penúltimo e último ínstar de *T. l. licus* tratadas com duas aplicações de diferentes quantidades de dsRNA. Os dados apresentados correspondem ao dia 15 após a ingestão da dieta contendo a primeira aplicação das moléculas de dsRNA. O asterisco (\*) representa o tratamento com diferenças significativas (Valor P < 0,05; ANOVA), em comparação ao controle com dsGFP.

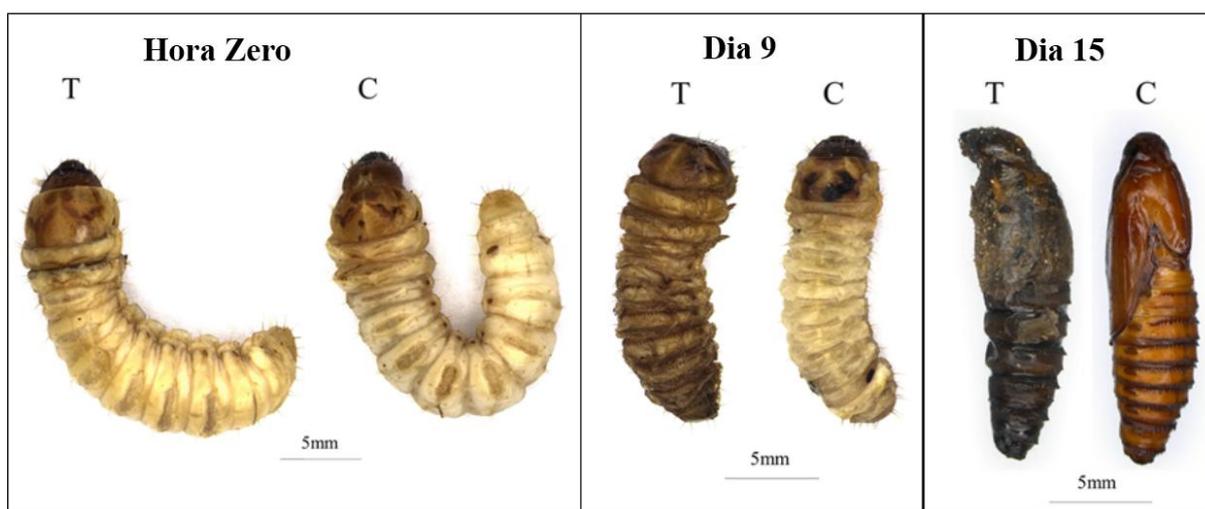
Por outro lado, as larvas de último ínstar de *T. l. licus* tratadas com dsTljhe não apresentaram redução significativa de tamanho (MCT= 29,2 mm ± 6,4), em relação ao controle com dsGFP (MCT= 32,5 mm ± 4,7) (Figura 33). Adicionalmente, nas larvas tratadas com dsTljhe foram observados aparentes sintomas de déficit nutricional e perda de peso gradual, até culminar na morte da larva por inanição (Figura 34).



**Figura 33.** Efeito fenotípico associado à supressão do gene *jhe* em larvas de penúltimo ínstar de *T. l. licus*. A figura mostra as diferenças morfológicas das larvas em vista dorsal, em diferentes tempos após a ingestão das moléculas de dsTljhe (hora zero). T: Larvas tratadas com duas doses de 5 µg de dsTljhe. C: Larvas tratadas com duas doses de 5 µg de dsGFP.

Porém, foram observadas mudanças de coloração nas larvas de último instar, tratadas com dsTljhe, a partir de nove dias após o início do experimento e pupação anormal, a partir de quinze dias (Figura 34). Finalmente, é necessário esclarecer que não foi possível fazer uma avaliação estatística do efeito fenotípico na fase adulta dos indivíduos de broca-gigante tratados. Isto ocorreu devido à dificuldade de se realizar o acompanhamento de todo o ciclo de desenvolvimento de *T. l. licus* e também, devido as baixas quantidades de adultos que emergiram durante o experimento (< 50%).

Estudos prévios reportando silenciamento do gene *jhe* em lepidópteros mostraram efeitos como perda de peso das larvas e/ou malformações nos adultos (Kontogiannatos *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2015; Chikate *et al.*, 2016; Vatanparast *et al.*, 2017). No presente estudo, não foram avaliadas a perda de peso e nem malformações nos adultos. Não obstante, as avaliações quanto à diminuição no tamanho das larvas e as deformações nas pupas podem ser usadas como equivalentes para a determinação dos efeitos fenotípicos.

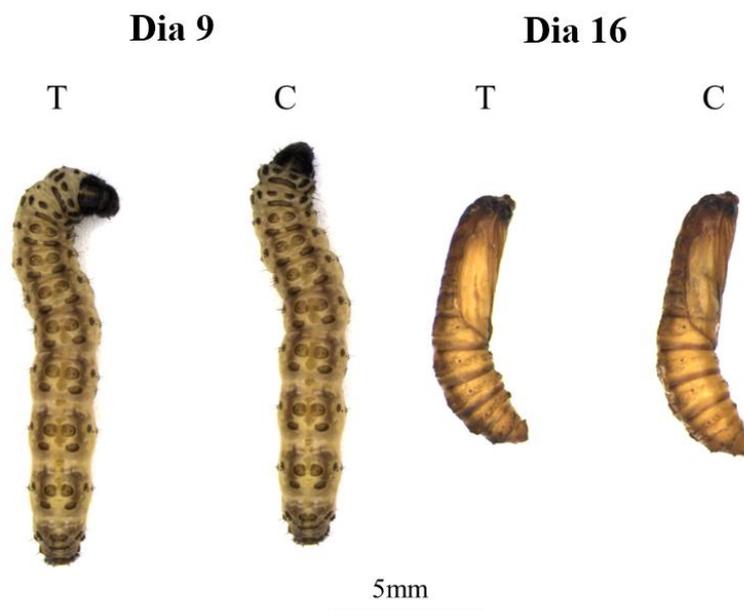


**Figura 34.** Efeito fenotípico associado à supressão do gene *jhe* em larvas de último instar de *T. l. licus*. A figura ilustra as diferenças morfológicas das larvas (em vista dorsal) e das pupas (em vista lateral), em diferentes tempos após a ingestão das moléculas de dsRNA (hora zero). T: Larvas tratadas com duas doses de 5 µg de dsTljhe. C: Larvas tratadas com duas doses de 5 µg de dsGFP.

De acordo com a literatura, a JHE controla o processo de metamorfose por meio de a degradação do JH, induzindo a larva de último instar a interromper seu crescimento e se preparar para entrar em fase de pupa (Riddiford, 2012). Desta forma, a redução dos níveis desta enzima deve levar em teoria, a um crescimento anormal da larva e atrasos no processo de metamorfose. Este efeito foi demonstrado em *P. xylostella* por RNAi (Gu *et al.*, 2015) e mais recentemente, em *B. mori*, mediante a supressão total do gene *jhe* por CRISPR/Cas9 (Zhang, Z. *et al.*, 2017).

Não obstante, nos experimentos de RNAi com *H. armigera* foi observado o efeito contrário. As larvas tratadas com dsRNA específico para o gene *jhe* nesse inseto apresentaram perda de peso de até 50% (Chikate *et al.*, 2016; Vatanparast *et al.*, 2017). No presente estudo, foi observado um resultado similar em larvas de penúltimo ínstar de *T. l. licus*, mostrando redução de tamanho de até 70% nas larvas tratadas com dsTljhe. Esses efeitos contraditórios podem estar relacionados com fatores já mencionados anteriormente, como atividade específica da JHE em um determinado momento do desenvolvimento do inseto, variações de expressão e de função das diferentes cópias do gene *jhe*, e a eficiência do RNAi sistêmico típica de cada espécie.

Um fato interessante observado neste trabalho é que o silenciamento do gene *jhe* produz um efeito fenotípico letal em larvas *T. l. licus*, mas não em larvas de *D. saccharalis* (Figura 35). Uma vez que a supressão do gene foi demonstrada nos dois insetos, pode-se inferir que a resposta fenotípica diferenciada se deve às isoformas encontradas para cada inseto serem cópias diferentes do gene. Embora a ausência de um genoma sequenciado para os dois insetos impeça afirmar com certeza, nossos resultados de análise filogenética, estrutura das proteínas e perfil de expressão dos genes *Tljhe* e *Dsjhe*, indicaram que estes genes são isoformas diferentes do gene codificante para a JHE.



**Figura 35.** Ausência de efeito fenotípico associado à supressão do gene *jhe* em larvas de penúltimo ínstar de *D. saccharalis*. A figura ilustra larvas (em vista dorsal) e pupas (em vista lateral), em diferentes tempos após a ingestão das moléculas de dsRNA (0 horas). T: Larvas tratadas com duas doses de 5µg de dsDsjhe. C: Larvas tratadas com duas doses de 5 µg de dsGFP.

Foi demonstrado recentemente que isoformas diferentes do JHE podem estar associadas tanto a funções diferentes em tecidos específicos do inseto (Steiner *et al.*, 2017), quanto a padrões de expressão únicos ao longo das diferentes fases de desenvolvimento (Kontogiannatos *et al.*, 2016). Desta forma a supressão de uma determinada isoforma pode produzir efeitos fenotípicos exclusivos, não observados com a supressão de qualquer outra isoforma. Apesar de ser uma explicação plausível para explicar a ausência de mortalidade ou efeito fenotípico, exibida por larvas de *D. saccharalis*, não devem ser descartadas outras possibilidades, como a eficiência específica do RNAi em cada inseto, que tem sido apontada como uma das principais causas da inconsistência dos experimentos de RNAi em lepidópteros (Terenius *et al.*, 2011).

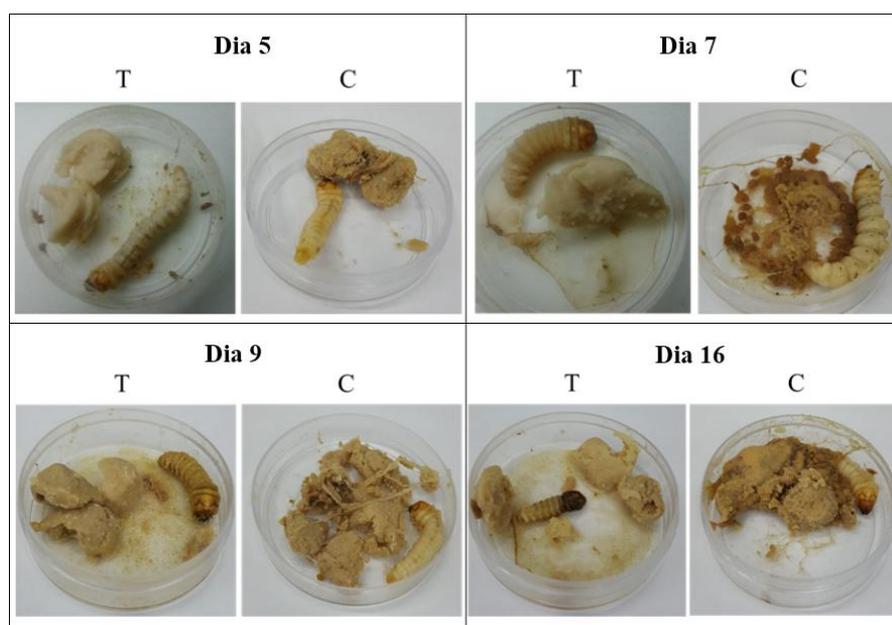
A expressão diferenciada das isoformas do JHE em função da fase de desenvolvimento, também pode explicar os diferentes efeitos fenotípicos observados após a supressão do gene *Tljhe*, entre larvas de penúltimo e último ínstar de *T. l. licus*. Segundo o perfil de expressão do gene *Tljhe* observado em *T. l. licus*, não existe diferença no nível de expressão do gene entre as larvas de penúltimo e último ínstar. Porém, para fase de pré-pupa, que representa uma parte essencial do último ínstar larval, foi observado um nível de expressão maior. Isto pode explicar a menor taxa de mortalidade observada em larvas de último ínstar tratadas com ds*Tljhe*, uma vez que a maior expressão do gene alvo pode produzir um efeito compensatório mais eficiente, conseguindo traduzir quantidades suficientes da proteína para evitar efeitos letais no inseto.

Além do possível efeito compensatório, sugerimos que as diferenças mencionadas no parágrafo anterior, assim com o próprio efeito fenotípico, se devam a um efeito indireto da supressão do gene *Tljhe*. Esta suposição foi fundamentada em dois fatos reportados na literatura e observados neste estudo: 1) a pouca eficiência do RNAi sistêmico em Lepidoptera e 2) o efeito do jejum na produção de JHE.

Como foi discutido anteriormente no texto, o silenciamento sistêmico foi menos eficiente que o localizado, especialmente para *T. l. licus*, além disso a entrega de dsRNA por microinjeção não apresentou silenciamento do gene *jhe* em quantidades abaixo de 10 µg. Isto pode se dever à presença de nucleases específicas da hemolinfa capazes de degradar com maior eficiência o dsRNA do que as nucleases presentes no intestino (Shukla *et al.*, 2016). Porém, nós observamos redução da expressão do gene *jhe* na carcaça de larvas tratadas com entrega oral do dsRNA. Para isto acontecer, as moléculas de dsRNA devem ser absorvidas pelas células do intestino e chegar na hemolinfa onde serão distribuídas no restante de tecidos, induzindo assim o RNAi sistêmico.

O questionamento que surge então é, se a atividade de nucleases presentes na hemolinfa estão diminuindo a resposta do RNAi sistêmico, o efeito de silenciamento na carcaça por entrega oral do dsRNA deveria apresentar os mesmos resultados que a microinjeção, uma vez que as moléculas de dsRNA entrariam em contato direto com a hemolinfa, se submetendo as mesmas condições nos dois casos. A nossa hipótese é que o efeito de RNAi sistêmico do gene *jhe* observado nos dois insetos, não é produzido pelas moléculas de dsRNA administradas, mas sim por um efeito indireto. Essa hipótese está baseada também em observações obtidas neste estudo, embora não conclusivas, uma vez que não foram realizadas réplicas suficientes para a análise estatística.

A observação mencionada consistiu num aparente padrão comportamental exibido pelas larvas de penúltimo ínstar tratadas com ds*Tljhe*, as quais entraram em um período de jejum anormal. Pode-se observar pelos resultados ilustrados na Figura 36 que as larvas tratadas com dsGFP, alimentaram-se normalmente da dieta fornecida em diferentes períodos de tempo após a ingestão da primeira dose de dsRNA. Em contrapartida, as larvas tratadas com ds*Tljhe* pararam de se alimentar e começaram a exibir o fenótipo anormal já descrito nas páginas 99-100. Acredita-se que o silenciamento localizado do gene *Tljhe*, nas células do intestino de larvas de *T. l. licus*, pode ter gerado um desbalanço nos níveis do JH alterando assim, a homeostase do intestino, como foi reportado antes em *D. melanogaster* (Rahman *et al.*, 2017).



**Figura 36.** Comportamento alimentar associado à supressão do gene *jhe* em larvas de penúltimo ínstar de *T. l. licus*. Pode observar-se uma interrupção na alimentação das larvas tratadas, e uma conseqüente deficiência nutricional refletida em um crescimento anormal. Por outro lado, as larvas tratadas com dsGFP, alimentaram-se e cresceram normalmente. Dieta fresca foi fornecida para os insetos nos dias 5, 8 e 12. T: Larvas tratadas com duas doses de 5 µg de ds*Tljhe*. C: Larvas tratadas com duas doses de 5 µg de dsGFP.

É importante mencionar que este comportamento não foi observado em larvas de último ínstar tratadas com dsTl*jhe*. Provavelmente, porque o impacto do desbalanço osmótico não seja tão alto em larvas de último ínstar, devido ao fato que a transição para a fase de pupa inclui um período natural de jejum (pré-pupa). Este jejum anormal observado em larvas de penúltimo ínstar pode ser a causa real da redução da expressão do gene *jhe* de forma sistêmica. Foi reportado previamente que os períodos de jejum podem diminuir drasticamente os níveis de expressão do gene *jhe* em lepidópteros (Duan *et al.*, 2016). Adicionalmente, foi descrito em *D. melanogaster* que a regulação dos níveis do JH por médio da JHE, pode modificar o comportamento alimentar dos adultos (Stafford, 2016). Embora sejam necessários outro tipo de experimentos para comprovar que isso acontece de fato em *T. l. licus*. Concluindo, a soma dos resultados gerados neste trabalho é de grande importância para entender os possíveis mecanismos de regulação do hormônio juvenil em Lepidoptera.

## 5. Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho foi estudado pela primeira vez um gene relacionado com o hormônio juvenil em *T. l. licus* e *D. saccharalis*. Além disso, foi observada pela primeira vez em *T. l. licus*, resposta do RNAi por meio de entrega oral das moléculas de dsRNA, indicando ser uma técnica promissora para futura implementação no controle específico deste inseto praga da lavoura canavieira. Um importante aporte deste trabalho foi a identificação e parcial caracterização funcional do gene *jhe*, aumentando o conhecimento sobre a participação deste gene em diferentes aspectos fisiológicos dos insetos. Foram descritas as doses necessárias para induzir um efeito consistente de RNAi, assim como o tempo de persistência do mesmo. Adicionalmente foi demonstrada, para as espécies estudadas, a baixa eficiência do RNAi sistêmico, relatada previamente para um grande número de lepidópteros. Este conjunto de dados pode ser usado como uma guia para desenhar novos experimentos de RNAi visando validar moléculas de dsRNA que possam ser usadas para controlar a broca-gigante de forma eficiente. As observações discutidas sobre o efeito do jejum na expressão do gene *jhe* em *T. l. licus*, e seu papel como causador principal dos efeitos fenotípicos observados, deve ser comprovada com novos experimentos mostrando a correlação entre os períodos forçados de jejum e a supressão do gene *jhe*.

Por outro lado, não foi possível caracterizar funcionalmente o gene *jhe* em *D. saccharalis* nem observar nenhum efeito letal do uso de moléculas de dsRNA neste inseto. Acreditamos que um passo importante para explicar esses resultados negativos, é a obtenção dos genes completos para as diferentes cópias do *jhe* na broca da cana. Para isso é fundamental obter o genoma do inseto. Finalmente, é importante destacar a necessidade de realizar pesquisas básicas que permitam entender melhor os mecanismos fisiológicos e hormonais que regulam o desenvolvimento dos insetos. Uma melhor compreensão destes mecanismos deve ser a base para o desenvolvimento de estratégias de controle biotecnológicas com menores fatores de risco em termos de biossegurança e alta eficiência.

## Referências Bibliográficas

ADAMS, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, 2000. ISSN 0036-8075.

AHN, S. et al. Rapid mini-scale plasmid isolation for DNA sequencing and restriction mapping. **Biotechniques**, v. 29, n. 3, p. 466-468, 2000. ISSN 0736-6205.

ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome biology**, v. 11, n. 10, p. R106, 2010. ISSN 1474-760X.

ANDREWS, S. et al. **FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Babraham Bioinformatics. 2012** 2016.

ARONSTEIN, K.; SALDIVAR, E. Characterization of a honey bee Toll related receptor gene Am18w and its potential involvement in antimicrobial immune defense. **Apidologie**, v. 36, n. 1, p. 3-14, 2005. ISSN 0044-8435.

AWASAKI, T. et al. Essential role of the apoptotic cell engulfment genes draper and ced-6 in programmed axon pruning during *Drosophila* metamorphosis. **Neuron**, v. 50, n. 6, p. 855-867, 2006. ISSN 0896-6273.

BAI, H.; RAMASESHADRI, P.; PALLI, S. R. Identification and characterization of juvenile hormone esterase gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 8, p. 829-837, 2007. ISSN 0965-1748.

BAI, H. et al. Large-scale RNAi screen of G protein-coupled receptors involved in larval growth, molting and metamorphosis in the red flour beetle. **Bmc Genomics**, v. 12, n. 1, p. 388, 2011. ISSN 1471-2164.

BALLY, J. et al. In-plant protection against *Helicoverpa armigera* by production of long hpRNA in Chloroplasts. **Frontiers in plant science**, v. 7, 2016.

BARBOSA, R. H. et al. Influência de fatores abióticos na infestação de *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854)(Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar/Influence of abiotic factors infestation in *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854)(hemiptera: cercopidae) in sugar cane. **Comunicata Scientiae**, v. 5, n. 4, p. 524, 2014.

BARBOSA, R. H. et al. Controle químico e biológico de *Mahanarva fimbriolata* Stål, 1854 (Hemiptera: Cercopidae) para regiões produtoras de cana-de-açúcar de Mato Grosso do Sul Chemical and biological control of *Mahanarva fimbriolata* Stål, 1854 (Hemiptera: Cercopidae). **AMBIÊNCIA**, v. 11, n. 1, p. 247-251, 2015. ISSN 2175-9405.

BAUM, J. A. et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1322-1326, 2007. ISSN 1087-0156.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014. ISSN 1460-2059.

BOTELHO, P. Tabela de vida ecológica e simulação da fase larval da *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794)(Lep.: Pyralidae). **Tabela de vida ecológica e simulação da fase larval da *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794)(Lep., Pyralidae)**, 1985.

BOTELHO, P.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole Ltda, 2002. cap. 25, p.409-425.

BOTELHO, P. S. M. G., J. F.; MACEDO, L. P. M. . Outras lagartas que atacam a cana-de-açúcar. In: PINTO, A. D. S. (Ed.). **Controle de Pragas da cana-de-açúcar**. Sertãozinho - SP: BIOCONTROL, 2006. p.25-28.

BRISCENO, S. **Informações sobre: lepidopteros da família Castiniidae - Distribuição geográfica das espécies conhecidas na América tropical e subtropical e importância econômica da *Castnia licus* Drury, 1773 no nordeste do Brasil**. Maceió, AL: Cooperativa regional dos produtores de açúcar e álcool de Alagoas: 20 p. 2008.

BROEDERS, S. et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. **Trends in food science & technology**, v. 37, n. 2, p. 115-126, 2014. ISSN 0924-2244.

BULLARD, J. H. et al. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 94, 2010. ISSN 1471-2105.

CARVALHO, M. M. et al. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E GENERALIDADES PARA O CONTROLE DE *Telchin licus* Drury, 1773 (Lepidoptera: Castniidae) EM CANA-DE-AÇÚCAR. **Enciclopédia Biosfera**, p. 1623-1637, 2013. ISSN 1809-0583.

CASTEL, S. E.; MARTIENSSEN, R. A. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 2, p. 100-112, 2013. ISSN 1471-0056.

CATALAN, M. APONTAMENTOS ACERCA DA RELEVÂNCIA DO DIREITO DE DANOS NO BALIZAMENTO DA PRODUÇÃO E DA COMERCIALIZAÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS E PRODUTOS TRANSGÊNICOS NO BRASIL. **Revista Jurídica Eletrônica da UFPI**, v. 2, n. 01, p. 191, 2015.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. Melhoria da cana-de-açúcar: marco sucro-alcooleiro no Brasil. **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, p. 307, 2004.

CHENG, D. et al. Genome-wide comparison of genes involved in the biosynthesis, metabolism, and signaling of juvenile hormone between silkworm and other insects. **Genetics and molecular biology**, v. 37, n. 2, p. 444-459, 2014. ISSN 1415-4757.

CHEONG, S. P. et al. Evolution of ecdysis and metamorphosis in arthropods: the rise of regulation of juvenile hormone. **Integrative and comparative biology**, v. 55, n. 5, p. 878-890, 2015. ISSN 1557-7023.

CHIKATE, Y. R. et al. RNAi of selected candidate genes interrupts growth and development of *Helicoverpa armigera*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 133, p. 44-51, 2016. ISSN 0048-3575.

CHILIAN, J. et al. Expression of LHC genes and their relation to photo-oxidative stress tolerance in *Solanum lycopersicum* L. and *Solanum chilense* (dunal) reiche. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 71, n. 4, p. 503, 2011. ISSN 0718-5820.

COLEMAN, A. et al. Persistence and transgenerational effect of plant-mediated RNAi in aphids. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 2, p. 541-548, 2014. ISSN 0022-0957.

COLLINS, F. S. et al. A vision for the future of genomics research. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 835-847, 2003. ISSN 0028-0836.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2017/18**. Brasília: Conab. 4: 1-57 p. 2017.

CONESA, A. et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome biology**, v. 17, n. 1, p. 13, 2016. ISSN 1474-760X.

CONNAHS, H.; RHEN, T.; SIMMONS, R. B. Transcriptome analysis of the painted lady butterfly, *Vanessa cardui* during wing color pattern development. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 270, 2016. ISSN 1471-2164.

CONSORTIUM, A. G. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **nature**, v. 408, n. 6814, p. 796, 2000. ISSN 1476-4687.

CONSORTIUM, I. S. G. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 12, p. 1036-1045, 2008. ISSN 0965-1748.

CONSORTIUM, M. G. S. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 520, 2002. ISSN 1476-4687.

CRAVA, C. M.; BRÜTTING, C.; BALDWIN, I. T. Transcriptome profiling reveals differential gene expression of detoxification enzymes in a hemimetabolous tobacco pest after feeding on jasmonate-silenced *Nicotiana attenuata* plants. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 1005, 2016. ISSN 1471-2164.

CRAVEIRO, K. I. et al. Variant Cry1Ia toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer. **Journal of biotechnology**, v. 145, n. 3, p. 215-221, 2010. ISSN 0168-1656.

CRUSOE, M. R. et al. The khmer software package: enabling efficient nucleotide sequence analysis. **F1000Research**, v. 4, 2015.

CRUZ, I. A Broca da Cana-de-Açúcar, *Diatraea saccharalis*, em Milho, no Brasil. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2007.

CURTIS, D.; LEHMANN, R.; ZAMORE, P. D. Translational regulation in development. **Cell**, v. 81, n. 2, p. 171-178, 1995. ISSN 0092-8674.

DAHM, K. H. et al. On the identity of the juvenile hormone in insects. In: GILBERT, L. (Ed.). **The juvenile hormones**. Boston, MA: Springer Science & Business Media, 2012. cap. 3, p.19-47. ISBN 1468479474.

DANIELS, J.; BRIAN, R. Evolution and Taxonomy. In: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**: Elsevier, v.11, 2015. cap. 7-84, ISBN 1483289982.

DAVIES, S. A. et al. Cell signalling mechanisms for insect stress tolerance. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 1, p. 119-128, 2014. ISSN 0022-0949.

DAVOLOS, C. C. et al. Binding analysis of *Bacillus thuringiensis* Cry1 proteins in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of invertebrate pathology**, v. 127, p. 32-34, 2015. ISSN 0022-2011.

DE ALMEIDA, L. Broca da cana causa prejuízos milionários. 2016. Disponível em: <<http://www.canalbioenergia.com.br/artigoprejuizos-bilionarios-causados-pela-broca-da-cana/>>. Acesso em: 22-11.

DE ALMEIDA, L.; ARRIGONI, E. D. B. Biological parameters of the giant sugarcane borer, *Telchin licus licus* (Drury, 1773). **Revista de Agricultura (Piracicaba)**, v. 84, n. 1, p. 56-61, 2009. ISSN 0034-7655.

DE ASSIS FONSECA, F. C. **Aplicação de estratégias moleculares visando o controle da broca-gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*, Drury 1770) (Lepidoptera: Castiniidae)**. 2013. 234 (PhD). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Não Publicado.

DE ASSIS FONSECA, F. C. et al. Sugarcane giant borer transcriptome analysis and identification of genes related to digestion. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0118231, 2015. ISSN 1932-6203.

DE OLIVEIRA, A. R.; BRAGA, M. B.; WALKER, A. M. Comportamento vegetativo e qualidade tecnológica de cultivares de cana-de-açúcar submetidas ao estresse hídrico em condições semiáridas do Brasil (Behavior vegetative and technological characteristics sugarcane cultivars under water stress in semi-arid). **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, p. 525-541, 2015. ISSN 1984-2295.

DINARDO-MIRANDA, L. L. et al. Reaction of sugarcane cultivars to sugarcane borer. **Bragantia**, v. 72, n. 1, p. 29-34, 2013. ISSN 0006-8705.

DOMINGUEZ, C. V.; MAESTRO, J. L. Expression of juvenile hormone acid O-methyltransferase and juvenile hormone synthesis in *Blattella germanica*. **Insect Science**, 2017. ISSN 1744-7917.

DUAN, D. et al. Modulation of Juvenile Hormone Esterase Gene Expression Against Development of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of economic entomology**, v. 109, n. 2, p. 865-872, 2016. ISSN 1938-291X.

DZITOYEVA, S.; DIMITRIJEVIC, N.; MANEV, H. Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system. **Molecular psychiatry**, v. 6, n. 6, p. 665, 2001. ISSN 1359-4184.

EBC. Cana-de-Açúcar Transgênica - CTNBio aprova e Brasil será primeiro país do mundo a iniciar a produção. 2017. Disponível em: < <http://www.defesanet.com.br/tecnologia/noticia/26048/Cana-de-Acucar-Transgenica---CTNBio-aprova-e-Brasil-sera-primeiro-pais-do-mundo-a-iniciar-a-producao/> >. Acesso em: 20-11.

EL-SHEIKH, E.-S. A.; KAMITA, S. G.; HAMMOCK, B. D. Effects of juvenile hormone (JH) analog insecticides on larval development and JH esterase activity in two spodopterans. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 128, p. 30-36, 2016. ISSN 0048-3575.

ELBEHRI, A.; SEGERSTEDT, A.; LIU, P. **Biofuels and the sustainability challenge: a global assessment of sustainability issues, trends and policies for biofuels and related feedstocks**. Roma: Trade and Market Division: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2013. ISBN 9251074143.

FIERS, W. et al. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. **Nature**, v. 260, n. 5551, p. 500-507, 1976. ISSN 0028-0836.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998. ISSN 0028-0836.

FIRMINO, A. A. P. et al. Transcriptome analysis in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA interference in insect pests. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e85079, 2013. ISSN 1932-6203.

FRIZZI, A.; HUANG, S. Tapping RNA silencing pathways for plant biotechnology. **Plant biotechnology journal**, v. 8, n. 6, p. 655-677, 2010. ISSN 1467-7652.

FU, C. et al. next-generation sequencing. **Journal of Medical Genetics**, v. 54, n. 3, p. 190-195, 2017.

FU, K. Y. et al. Knockdown of juvenile hormone acid methyl transferase severely affects the performance of *Leptinotarsa decemlineata* (Say) larvae and adults. **Pest management science**, v. 72, n. 6, p. 1231-1241, 2016. ISSN 1526-4998.

FU, K. Y. et al. Characterization and functional study of a putative juvenile hormone diol kinase in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 90, n. 3, p. 154-167, 2015. ISSN 1520-6327.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. São Paulo: Piracicaba, FEALQ, 2002. 920.

GARBER, M. et al. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. **Nature methods**, v. 8, n. 6, p. 469-477, 2011. ISSN 1548-7091.

GARBUTT, J. S. et al. 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. ISSN 0022-1910.

GAZARA, R. K. et al. De novo transcriptome sequencing and comparative analysis of midgut tissues of four non-model insects pertaining to Hemiptera, Coleoptera, Diptera and Lepidoptera. **Gene**, v. 627, p. 85-93, 2017. ISSN 0378-1119.

GIRAY, T.; GIOVANETTI, M.; WEST-EBERHARD, M. J. Juvenile hormone, reproduction, and worker behavior in the neotropical social wasp *Polistes canadensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 9, p. 3330-3335, 2005. ISSN 0027-8424.

GOG, L. et al. Larval *Helicoverpa zea* transcriptional, growth and behavioral responses to nicotine and *Nicotiana tabacum*. **Insects**, v. 5, n. 3, p. 668-688, 2014.

GRABHERR, M. G. et al. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644, 2011.

GRANATA, L. et al. From trash to treasure: detecting unexpected contamination in unmapped NGS data. **PeerJ Preprints**, v. 5, p. e3230v1, 2017. ISSN 2167-9843.

GU, X. et al. A whole genome screening and RNA interference identify a juvenile hormone esterase-like gene of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of insect physiology**, v. 80, p. 81-87, 2015. ISSN 0022-1910.

GUAGLIUMI, P. Pragas da cana-de-açúcar: Nordeste do Brasil. 1972.

GUJAR, H.; PALLI, S. R. Krüppel homolog 1 and E93 mediate Juvenile hormone regulation of metamorphosis in the common bed bug, *Cimex lectularius*. **Scientific reports**, v. 6, p. 26092, 2016. ISSN 2045-2322.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **The insects: an outline of entomology**. 5. John Wiley & Sons, 2014. 624 ISBN 111884615X.

GUO, Y. et al. Transcriptome Analysis and Identification of Major Detoxification Gene Families and Insecticide Targets in *Grapholita Molesta* (Busck)(Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Insect Science**, v. 17, n. 2, 2017.

HAAS, B. J. et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nature protocols**, v. 8, n. 8, p. 1494-1512, 2013. ISSN 1754-2189.

HALL, T.; BIOSCIENCES, I.; CARLSBAD, C. BioEdit: an important software for molecular biology. **GERF Bull Biosci**, v. 2, n. 1, p. 60-61, 2011.

HARTFELDER, K.; EMLLEN, D. Endocrine Control of Insect Polyphenism. In: GILBERT, L. I. (Ed.). **Insect endocrinology**. Amsterdam: Elsevier, 2012. cap. 11, p.464-522. ISBN 0123847494.

HECKEL, D. G. Insect detoxification and sequestration strategies. In: VOELCKEL, C. e JANDER, G. (Ed.). **Insect-Plant Interactions**. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons, v.47, 2014. cap. 3, p.77-114. ISBN 1118829786.

HELLEMANS, J. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome biology**, v. 8, n. 2, p. R19, 2007. ISSN 1474-760X.

HENDRY, L. et al. Chemical messengers in insects and plants. In: WALLACE, J. (Ed.). **Biochemical interaction between plants and insects**. Boston, MA.: Springer Science & Business Media, v.10, 2013. cap. 7, p.351-384. ISBN 146842646X.

HERDE, M.; HOWE, G. A. Host plant-specific remodeling of midgut physiology in the generalist insect herbivore *Trichoplusia ni*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 50, p. 58-67, 2014. ISSN 0965-1748.

HOLT, R. A. et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **science**, v. 298, n. 5591, p. 129-149, 2002. ISSN 0036-8075.

HUANG, X. et al. Gut Transcriptome Analysis Shows Different Food Utilization Efficiency by the Grasshopper *Oedaleus asiaticus* (Orthoptera: Acrididae). **Journal of Economic Entomology**, p. tox128, 2017. ISSN 0022-0493.

HUANG, X. et al. Diet alters performance and transcription patterns in *Oedaleus asiaticus* (Orthoptera: Acrididae) grasshoppers. **PloS one**, v. 12, n. 10, p. e0186397, 2017. ISSN 1932-6203.

HUNTER, W. et al. Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli acute paralysis virus disease in honey bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). **PLoS pathogens**, v. 6, n. 12, p. e1001160, 2010. ISSN 1553-7374.

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. ISSN 0022-1910.

JESUDASON, P.; ANSPAUGH, D. D.; ROE, R. M. Juvenile hormone metabolism in the plasma, integument, midgut, fat body, and brain during the last instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 20, n. 2, p. 87-105, 1992. ISSN 1520-6327.

JIN, S. et al. Engineered chloroplast dsRNA silences cytochrome p450 monooxygenase, V-ATPase and chitin synthase genes in the insect gut and disrupts *Helicoverpa armigera* larval development and pupation. **Plant biotechnology journal**, v. 13, n. 3, p. 435-446, 2015. ISSN 1467-7652.

JOGA, M. R. et al. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. **Frontiers in physiology**, v. 7, 2016.

KAMITA, S. G. et al. Juvenile hormone (JH) esterase: why are you so JH specific? **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 33, n. 12, p. 1261-1273, 2003. ISSN 0965-1748.

KANOST, M. R.; JIANG, H.; YU, X. Q. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. **Immunological reviews**, v. 198, n. 1, p. 97-105, 2004. ISSN 1600-065X.

KARIM, S.; TROIANO, E.; MATHER, T. N. Functional genomics tool: gene silencing in *Ixodes scapularis* eggs and nymphs by electroporated dsRNA. **BMC biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1, 2010. ISSN 1472-6750.

KATOCH, R. et al. RNAi for insect control: current perspective and future challenges. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 171, n. 4, p. 847-873, 2013. ISSN 0273-2289.

KIM, J. et al. *Allomyrina dichotoma* larvae regulate food intake and body weight in high fat diet-induced obese mice through mTOR and MAPK signaling pathways. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 100, 2016.

KNOWLING, S.; MORRIS, K. V. Non-coding RNA and antisense RNA. Nature's trash or treasure? **Biochimie**, v. 93, n. 11, p. 1922-1927, 2011. ISSN 0300-9084.

KOCH, A.; KOGEL, K. H. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. **Plant biotechnology journal**, v. 12, n. 7, p. 821-831, 2014. ISSN 1467-7652.

KOLLIPOULOU, A.; SWEVERS, L. Recent progress in RNAi research in Lepidoptera: Intracellular machinery, antiviral immune response and prospects for insect pest control. **Current Opinion in Insect Science**, v. 6, p. 28-34, 2014. ISSN 2214-5745.

KONTOGIANNATOS, D.; SWEVERS, L.; KOURTI, A. Recent gene multiplication and evolution of a juvenile hormone esterase-related gene in a lepidopteran pest. **Gene Reports**, v. 4, p. 139-152, 2016. ISSN 2452-0144.

KONTOGIANNATOS, D. et al. Functional characterization of a juvenile hormone esterase related gene in the moth *Sesamia nonagrioides* through RNA interference. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73834, 2013. ISSN 1932-6203.

KRISHNAN, M. et al. Insect gut microbiome—An unexploited reserve for biotechnological application. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 4, p. S16-S21, 2014. ISSN 2221-1691.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016. ISSN 0737-4038.

LAKSHMANAN, P. et al. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 4, p. 345-363, 2005. ISSN 1054-5476.

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 323, 2011. ISSN 1471-2105.

LI, H.-S. et al. Variation in life history traits and transcriptome associated with adaptation to diet shifts in the ladybird *Cryptolaemus montrouzieri*. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 281, 2016. ISSN 1471-2164.

LI, H. et al. Transcriptome analysis and screening for potential target genes for RNAi-mediated pest control of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65931, 2013. ISSN 1932-6203.

LIM, Z. X. et al. Diet-delivered RNAi in *Helicoverpa armigera*—progresses and challenges. **Journal of insect physiology**, v. 85, p. 86-93, 2016. ISSN 0022-1910.

LIMA FILHO, M. U.; LIMA, J. O. G. Massas de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.)(Lepidoptera: Pyralidae) em cana-de-açúcar: número de ovos e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma* spp.(Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições naturais. **Neotropical Entomology**, 2001. ISSN 1519-566X.

LIU, Y. et al. Comparative transcriptome analysis of *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) reveals novel insights into heat stress tolerance in insects. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 974, 2017. ISSN 1471-2164.

LONG, W.; HENSLEY, S. Insect pests of sugar cane. **Annual review of entomology**, v. 17, n. 1, p. 149-176, 1972. ISSN 0066-4170.

LOPES, D. A. et al. Population genetics of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabr.)(Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 36, n. 2, p. 189-194, 2014. ISSN 1807-8621.

LU, K. et al. Nutritional signaling regulates vitellogenin synthesis and egg development through juvenile hormone in *Nilaparvata lugens* (Stål). **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 269, 2016.

LUO, Y. et al. Towards an understanding of the molecular basis of effective RNAi against a global insect pest, the whitefly *Bemisia tabaci*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 88, p. 21-29, 2017. ISSN 0965-1748.

MA, J. et al. Identification and comparative study of chemosensory genes related to host selection by legs transcriptome analysis in the tea geometrid *Ectropis obliqua*. **PLoS one**, v. 11, n. 3, p. e0149591, 2016. ISSN 1932-6203.

MA, L. et al. Transcriptome and gene expression analysis of *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae) during different development stages. **Journal of Insect Science**, v. 16, n. 1, p. 63, 2016. ISSN 1536-2442.

MACEDO, I. D. C. A energia da cana-de-açúcar: doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade. **Sao Paulo: UNICA**, 2005.

MACKERT, A. et al. Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L.—expression analysis and functional assays. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, n. 1, p. 33-44, 2008. ISSN 1096-4959.

MALIGEPPAGOL, M. et al. Transgenic tomato expressing dsRNA of juvenile hormone acid O-methyl transferase gene of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) affects larval growth and its development. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 20, n. 2, p. 559-567, 2017. ISSN 1226-8615.

MAMATHA, D. et al. RNA interference (RNAi) technology of microRNAs targeting juvenile hormone epoxide hydrolase (JHEH) gene for increased silk productivity in *Bombyx mori*. Computing for Sustainable Global Development (INDIACom), 2016 3rd International Conference on, 2016, IEEE. p.1636-1643.

MAO, Y.-B. et al. 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. ISSN 1087-0156.

MARTÍN, D. et al. RNAi studies reveal a conserved role for RXR in molting in the cockroach *Blattella germanica*. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 4, p. 410-416, 2006. ISSN 0022-1910.

MARTIN, J. A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 10, p. 671-682, 2011. ISSN 1471-0056.

MASON, C. J.; RAFFA, K. F. Acquisition and structuring of midgut bacterial communities in gypsy moth (Lepidoptera: Erebidæ) larvae. **Environmental entomology**, v. 43, n. 3, p. 595-604, 2014. ISSN 1938-2936.

MAZAMBANI, A. et al. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.;PINTO, A., *et al* (Ed.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. São Paulo: Piracicaba, v.2, 2006. p.11-18.

MENDONÇA, A.; BARBOSA, V.; MARQUES, E. As cigarrinhas da cana-de-açúcar (Hemiptera: Cercopidae) no Brasil. Pragas da cana-de-açúcar. In: MENDONÇA, A. (Ed.). **Pragas da cana-de-açúcar**. Maceió: Insetos & Cia, 1996. p.171-191.

MERZENDORFER, H. ABC transporters and their role in protecting insects from pesticides and their metabolites. **Adv Insect Physiol**, v. 46, p. 1-72, 2014.

METSALU, T.; VILO, J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W566-W570, 2015. ISSN 1362-4962.

MINAKUCHI, C. et al. Expressional and functional analysis of CYP15A1, a juvenile hormone epoxidase, in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Journal of insect physiology**, v. 80, p. 61-70, 2015. ISSN 0022-1910.

MORAES, S. S.; DUARTE, M. Morfologia externa comparada das três espécies do complexo *Telchin licus* (Drury)(Lepidoptera, Castniidae) com uma sinonímia. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 2, p. 245-265, 2009. ISSN 0085-5626.

MORIBE, Y. et al. Samui, a novel cold-inducible gene, encoding a protein with a BAG domain similar to silencer of death domains (SODD/BAG-4), isolated from *Bombyx* diapause eggs. **The FEBS Journal**, v. 268, n. 12, p. 3432-3442, 2001. ISSN 1432-1033.

MORTAZAVI, A. et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature methods**, v. 5, n. 7, p. 621-628, 2008. ISSN 1548-7091.

NAVA, D. E. N.; PINTO, A. D. S.; SILVA, S. D. A. **Controle biológico da broca da cana-de-açúcar**. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado 2009.

NEGRISOLI, J. et al. **Manejo da broca-gigante da cana-de-açúcar (Telchinlicus)(Drury)(Lepidoptera: Castniidae) no nordeste do Brasil**. Aracaju, SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros-Docmentos (INFOTECA-E) 2015.

NENE, V. et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, v. 316, n. 5832, p. 1718-1723, 2007. ISSN 0036-8075.

NICOLA, M. V.; DA SILVA JÚNIOR, M. P.; ROSSI, M. M. BROCA GIGANTE DA CANA-DE-AÇÚCAR, *Telchin licus licus* (Drury, 1773) NA REGIÃO CENTRO-SUL: PREOCUPAÇÃO PARA OS PRODUTORES. **Nucleus**, v. 5, n. 2, 2008. ISSN 1982-2278.

NÓBREGA, J. D.; DORNELAS, M. Biotecnologia e melhoramento da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.;PINTO, A., *et al* (Ed.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. São Paulo: Piracicaba, 2006. p.39-56.

NORIEGA, F. G. Juvenile hormone biosynthesis in insects: what is new, what do we know, and what questions remain? **International scholarly research notices**, v. 2014, 2014.

NYATI, P. et al. Farnesyl phosphatase, a corpora allata enzyme involved in juvenile hormone biosynthesis in *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71967, 2013. ISSN 1932-6203.

PARRA, J. R.; ZUCCHI, R. A. Trichogramma in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 3, p. 271-281, 2004. ISSN 1519-566X.

PERERA, O. P. et al. Generation of a transcriptome in a model lepidopteran pest, *Heliothis virescens*, using multiple sequencing strategies for profiling midgut gene expression. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0128563, 2015. ISSN 1932-6203.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFFLE, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36-e36, 2002. ISSN 1362-4962.

PINTO, A. **Comparação de técnicas de liberação e parasitismo de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1986 em infestações de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) prejudiciais à cana-de-açúcar**. 1999. 83 (PhD). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PINTO, A. D. S.; GARCIA, J.; OLIVEIRA, H. D. Manejo das principais pragas da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.;PINTO, A., *et al* (Ed.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. São Paulo: Piracicaba, 2006. p.257-280.

PITINO, M. et al. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e25709, 2011. ISSN 1932-6203.

POWELL, M. E. et al. Systemic RNAi in the small hive beetle *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae), a serious pest of the European honey bee *Apis mellifera*. **Pest management science**, v. 73, n. 1, p. 53-63, 2017. ISSN 1526-4998.

PRICE, D. R.; GATEHOUSE, J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 393-400, 2008. ISSN 0167-7799.

PRÜFER, K. et al. FUNC: a package for detecting significant associations between gene sets and ontological annotations. **BMC bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 41, 2007. ISSN 1471-2105.

QI, L. et al. De novo assembly and developmental transcriptome analysis of the small white butterfly *Pieris rapae*. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0159258, 2016. ISSN 1932-6203.

QUAN, G.; KANDA, T.; TAMURA, T. Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm white gene. **Insect molecular biology**, v. 11, n. 3, p. 217-222, 2002. ISSN 1365-2583.

RAHMAN, M. et al. Local Juvenile Hormone activity regulates gut homeostasis and tumor growth in adult *Drosophila*. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 11677, 2017. ISSN 2045-2322.

RAMOS, P. A evolução da agroindústria canavieira e os mercados de açúcar e de álcool carburante no Brasil: a necessidade de planejamento e controle. Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2008. p.2-18.

READ, T. D. et al. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. **Nature**, v. 423, n. 6935, p. 81, 2003. ISSN 1476-4687.

REAY-JONES, F. P. F. et al. Reduced susceptibility to tebufenozide in populations of the sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) in Louisiana. **Journal of economic entomology**, v. 98, n. 3, p. 955-960, 2005. ISSN 0022-0493.

RIBEIRO, T. P. et al. Transgenic cotton expressing Cry10Aa toxin confers high resistance to the cotton boll weevil. **Plant biotechnology journal**, 2017. ISSN 1467-7652.

RICHARDS, S.; GIBBS, R. A.; GERARDO, N. M. Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **PLoS Biol**, v. 8, n. 2, p. e1000313, 2010. ISSN 1545-7885 (Electronic) 1544-9173 (Linking).

RICHARDS, S. et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, v. 452, n. 7190, p. 949-955, 2008. ISSN 0028-0836.

RIDDIFORD, L. M. Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. **Advances in insect physiology**, v. 24, p. 213-274, 1994. ISSN 0065-2806.

\_\_\_\_\_. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? **General and comparative endocrinology**, v. 179, n. 3, p. 477-484, 2012. ISSN 0016-6480.

- RIDDIFORD, L. M. et al. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 33, n. 12, p. 1327-1338, 2003. ISSN 0965-1748.
- RISPE, C. et al. De novo transcriptome assembly of the grapevine phylloxera allows identification of genes differentially expressed between leaf-and root-feeding forms. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 219, 2016. ISSN 1471-2164.
- RIVALS, I. et al. Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: which test? **Bioinformatics**, v. 23, n. 4, p. 401-407, 2006. ISSN 1460-2059.
- ROBERTSON, G. et al. De novo assembly and analysis of RNA-seq data. **Nature methods**, v. 7, n. 11, p. 909-912, 2010. ISSN 1548-7091.
- ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010. ISSN 1367-4803.
- ROBINSON, M. D.; OSHLACK, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome biology**, v. 11, n. 3, p. R25, 2010. ISSN 1474-760X.
- RODRIGUES, T. B.; FIGUEIRA, A. Management of Insect Pest by RNAi—A New Tool for Crop Protection. In: (Ed.). **RNA Interference**: InTech, 2016.
- RÖLLER, H. et al. The structure of the juvenile hormone. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 6, n. 2, p. 179-180, 1967. ISSN 1521-3773.
- ROY, A. et al. Data set for diet specific differential gene expression analysis in three Spodoptera moths. **Data in brief**, v. 8, p. 448-455, 2016. ISSN 2352-3409.
- ROY, A. W. et al. Diet dependent metabolic responses in three generalist insect herbivores Spodoptera spp. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 71, p. 91-105, 2016. ISSN 0965-1748.
- SAIKI, R. et al. Polymerase chain reaction. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.
- SAITO, Y. et al. Juvenile hormone (JH) esterase activity but not JH epoxide hydrolase activity is downregulated in larval Adoxophyes honmai following nucleopolyhedrovirus infection. **Journal of insect physiology**, v. 80, p. 71-80, 2015. ISSN 0022-1910.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987. ISSN 1537-1719.

SARKIES, P.; MISKA, E. A. Small RNAs break out: the molecular cell biology of mobile small RNAs. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 525-535, 2014. ISSN 1471-0072.

SCOTT, J. G. et al. Towards the elements of successful insect RNAi. **Journal of insect physiology**, v. 59, n. 12, p. 1212-1221, 2013. ISSN 0022-1910.

SCUDDER, G. The importance of insects. In: FOOTITT, R. G. e ADLER, P. H. (Ed.). **Insect biodiversity: science and society**: John Wiley & Sons, 2009. cap. 2, p.7-32. ISBN 144430822X.

SEHNAL, F.; ŽITŇAN, D. Midgut endocrine cells. In: LEHANE, M. e BILLINGSLEY, P. (Ed.). **Biology of the insect midgut**. Netherlands: Springer Science & Business Media, 1996. cap. 3, p.55-85.

SHAH, M.; KHAN, A.; MIR, G. RNA INTERFERENCE FOR INSECT PEST MANAGEMENT-RECENT DEVELOPMENTS: A REVIEW. **Journal of Cell & Tissue Research**, v. 14, n. 3, 2014. ISSN 0973-0028.

SHUKLA, J. N. et al. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. **RNA biology**, v. 13, n. 7, p. 656-669, 2016. ISSN 1547-6286.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 2011. ISSN 1744-4292.

SIJEN, T. et al. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 465-476, 2001. ISSN 0092-8674.

SIMÃO, F. A. et al. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, v. 31, n. 19, p. 3210-3212, 2015. ISSN 1367-4803.

SONESON, C.; DELORENZI, M. A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. **BMC bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 91, 2013. ISSN 1471-2105.

SOUZA, T. P. et al. Comparative analysis of expression profiling of the trypsin and chymotrypsin genes from Lepidoptera species with different levels of sensitivity to soybean peptidase inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 196, p. 67-73, 2016. ISSN 1096-4959.

SPARKS, M. E. et al. A Transcriptome Survey Spanning Life Stages and Sexes of the Harlequin Bug, *Murgantia histrionica*. **Insects**, v. 8, n. 2, p. 55, 2017.

SPIT, J. et al. Effects of different dietary conditions on the expression of trypsin- and chymotrypsin-like protease genes in the digestive system of the migratory locust, *Locusta migratoria*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 48, p. 100-109, 2014. ISSN 0965-1748.

STAFFORD, J. **Juvenile Hormone esterase is a conserved regulator of starvation-induced behavior**. 2016. (PhD). Department of Zoology, University of British Columbia, Vancouver, Canada.

STAUDACHER, H. et al. Variability of bacterial communities in the moth *Heliothis virescens* indicates transient association with the host. **PLoS one**, v. 11, n. 5, p. e0154514, 2016. ISSN 1932-6203.

STEINER, C. et al. Neofunctionalization of “Juvenile Hormone Esterase Duplication” in *Drosophila* as an odorant-degrading enzyme towards food odorants. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 12629, 2017. ISSN 2045-2322.

STRONG, M. J. et al. Microbial contamination in next generation sequencing: implications for sequence-based analysis of clinical samples. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 11, p. e1004437, 2014. ISSN 1553-7374.

SUPEK, F. et al. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. **PLoS one**, v. 6, n. 7, p. e21800, 2011. ISSN 1932-6203.

SURAKASI, V. P.; MOHAMED, A. A.; KIM, Y. RNA interference of  $\beta 1$  integrin subunit impairs development and immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Journal of insect physiology**, v. 57, n. 11, p. 1537-1544, 2011. ISSN 0022-1910.

SWEVERS, L. et al. Persistent RNA virus infection of lepidopteran cell lines: interactions with the RNAi machinery. **Journal of insect physiology**, v. 93, p. 81-93, 2016. ISSN 0022-1910.

TANG, B. et al. Transcriptome analysis and identification of induced genes in the response of *Harmonia axyridis* to cold hardiness. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 22, p. 78-89, 2017. ISSN 1744-117X.

TASSETTO, M.; KUNITOMI, M.; ANDINO, R. Circulating Immune Cells Mediate a Systemic RNAi-Based Adaptive Antiviral Response in *Drosophila*. **Cell**, v. 169, n. 2, p. 314-325. e13, 2017. ISSN 0092-8674.

TELLAM, R. L. The peritrophic matrix. In: LEHANE, M. e BILLINGSLEY, P. (Ed.). **Biology of the insect midgut**. 1. Netherlands: Springer Science & Business Media, 1996. cap. 4, p.86-114. ISBN 9400915195.

TERENIUS, O. et al. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 2, p. 231-245, 2011. ISSN 1879-1611 (Electronic)

0022-1910 (Linking).

TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 47, n. 2, p. 47-61, 2001. ISSN 1520-6327.

THAKUR, N. et al. 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. ISSN 1932-6203.

TIMMONS, L.; FIRE, A. Specific interference by ingested dsRNA. **Nature**, v. 395, n. 6705, p. 854-854, 1998. ISSN 0028-0836.

TOMOYASU, Y.; DENELL, R. E. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. **Development genes and evolution**, v. 214, n. 11, p. 575-578, 2004. ISSN 0949-944X.

TRUMAN, J. et al. Juvenile hormone is required to couple imaginal disc formation with nutrition in insects. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1385-1388, 2006. ISSN 0036-8075.

TURNER, C. et al. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. **Insect molecular biology**, v. 15, n. 3, p. 383-391, 2006. ISSN 1365-2583.

ULVILA, J. et al. Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptor-mediated endocytosis in *Drosophila* S2 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 20, p. 14370-14375, 2006. ISSN 0021-9258.

VACARI, A. M. et al. Fonte proteica na criação de *Diatraea saccharalis* e seu reflexo na produção e no controle de qualidade de *Cotesia flavipes*. **Bragantia**, p. 355-361, 2012. ISSN 0006-8705.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. research0034. 1, 2002. ISSN 1474-760X.

VATANPARAST, M. et al. RNA interference-mediated knockdown of some genes involved in digestion and development of *Helicoverpa armigera*. **Bulletin of Entomological Research**, p. 1-14, 2017. ISSN 0007-4853.

VILLAS BOAS, A. Patogenicidade de *Beauveria* spp. eo seu efeito associado ao inseticida monocrotophos sobre *Castnia licus* (Dury, 1770)(Lepidoptera-Castniidae). 1986.

VOGEL, H. et al. A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 308, 2011. ISSN 1471-2164.

VOGEL, H.; MUSSER, R. O.; CELORIO-MANCERA, M.-L. Transcriptome responses in herbivorous insects towards host plant and toxin feeding. **Annual plant reviews**, v. 47, p. 197-233, 2014.

WADT, L. **Comportamento reprodutivo da broca gigante da cana-de-açúcar, *Teuchoclypeus bicolor* (Drury, 1773)(Lepidoptera: Castniidae), como base para seu controle.** 2012. 79 (PhD). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

WANG, K. et al. Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation in vivo. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 77, p. 1-9, 2016. ISSN 0965-1748.

WANG, M.; JIN, H. Spray-induced gene silencing: a powerful innovative strategy for crop protection. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 1, p. 4-6, 2017. ISSN 0966-842X.

WANG, X. et al. Comparative transcriptome analysis of *Bombyx mori* spinnerets and Filippi's glands suggests their role in silk fiber formation. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 68, p. 89-99, 2016. ISSN 0965-1748.

WANG, Y. et al. Identification and comparison of candidate olfactory genes in the olfactory and non-olfactory organs of elm pest *Ambrostoma quadriimpressum* (Coleoptera: Chrysomelidae) based on transcriptome analysis. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0147144, 2016. ISSN 1932-6203.

WANG, Y. et al. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 754-761, 2009. ISSN 0028-0836.

WANG, Y. et al. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. **PLoS one**, v. 6, n. 4, p. e18644, 2011. ISSN 1932-6203.

WANG, Z. et al. RNAi silencing of the HaHMG-CoA reductase gene inhibits oviposition in the *Helicoverpa armigera* cotton bollworm. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e67732, 2013. ISSN 1932-6203.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009. ISSN 1471-0056.

WARD, V. K. et al. Analysis of the catalytic mechanism of juvenile hormone esterase by site-directed mutagenesis. **International journal of biochemistry**, v. 24, n. 12, p. 1933-1941, 1992. ISSN 0020-711X.

WEGENER, K. L.; CAMPBELL, I. D. Transmembrane and cytoplasmic domains in integrin activation and protein-protein interactions. **Molecular membrane biology**, v. 25, n. 5, p. 376-387, 2008. ISSN 0968-7688.

WEI, D. et al. Transcriptome analysis to identify genes for peptides and proteins involved in immunity and reproduction from male accessory glands and ejaculatory duct of *Bactrocera dorsalis*. **Peptides**, v. 80, p. 48-60, 2016. ISSN 0196-9781.

WEINSTOCK, G. M.; ROBINSON, G. E.; GIBBS, R. A. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature**, v. 443, n. 7114, p. 931-949, 2006. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking).

WHEAT, C. W. et al. The genetic basis of a plant–insect coevolutionary key innovation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 51, p. 20427-20431, 2007. ISSN 0027-8424.

WINNEBECK, E. C.; MILLAR, C. D.; WARMAN, G. R. Why does insect RNA look degraded? **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 1, p. 159, 2010. ISSN 1536-2442.

WU, C. et al. De Novo Transcriptome Analysis of the Common New Zealand Stick Insect *Clitarchus hookeri* (Phasmatodea) Reveals Genes Involved in Olfaction, Digestion and Sexual Reproduction. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0157783, 2016. ISSN 1932-6203.

XIA, X. et al. Metagenomic sequencing of diamondback moth gut microbiome unveils key holobiont adaptations for herbivory. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017.

XIA, X. et al. DNA sequencing reveals the midgut microbiota of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and a possible relationship with insecticide resistance. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68852, 2013. ISSN 1932-6203.

XIANG, M. et al. Comparative transcriptome analysis provides insights of anti-insect molecular mechanism of *Cassia obtusifolia* trypsin inhibitor against *Pieris rapae*. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 97, n. 1, 2018. ISSN 1520-6327.

XIONG, Y. et al. 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.

YANG, P. et al. Transcriptome analysis of sexually dimorphic Chinese white wax scale insects reveals key differences in developmental programs and transcription factor expression. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

YANG, Y. et al. Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and-resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 40, n. 8, p. 592-603, 2010. ISSN 0965-1748.

YANG, Y. et al. Down regulation of a gene for cadherin, but not alkaline phosphatase, associated with Cry1Ab resistance in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25783, 2011. ISSN 1932-6203.

YAZDANI, U.; TERMAN, J. R. The semaphorins. **Genome biology**, v. 7, n. 3, p. 211, 2006. ISSN 1474-760X.

YI, X. et al. Differential expression of chemosensory-protein genes in midguts in response to diet of *Spodoptera litura*. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

YIN, C. et al. ChiloDB: a genomic and transcriptome database for an important rice insect pest *Chilo suppressalis*. **Database**, v. 2014, 2014.

YIN, C. et al. InsectBase: a resource for insect genomes and transcriptomes. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D801-D807, 2016. ISSN 0305-1048.

YU, N. et al. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. **Insect science**, v. 20, n. 1, p. 4-14, 2013. ISSN 1744-7917.

ZDOBNOV, E. M.; BORK, P. Quantification of insect genome divergence. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 1, p. 16-20, 2007. ISSN 0168-9525.

ZHA, S. et al. Cloning and functional analysis of farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) gene from *Mylabris cichorii*. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 64, n. 5, p. 667-676, 2017. ISSN 1470-8744.

ZHA, W. et al. 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. ISSN 1932-6203.

ZHANG, H.; LI, H. C.; MIAO, X. X. Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. **Insect science**, v. 20, n. 1, p. 15-30, 2013. ISSN 1744-7917.

ZHANG, J. et al. The impact of next-generation sequencing on genomics. **Journal of genetics and genomics**, v. 38, n. 3, p. 95-109, 2011. ISSN 1673-8527.

ZHANG, J. et al. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. **Science**, v. 347, n. 6225, p. 991-994, 2015. ISSN 0036-8075.

ZHANG, J. et al. Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection. **Trends in biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 871-882, 2017. ISSN 0167-7799.

ZHANG, L. et al. Fitness costs and stability of Cry1Ab resistance in sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (F.). **Journal of invertebrate pathology**, v. 117, p. 26-32, 2014. ISSN 0022-2011.

ZHANG, Q.; YUAN, M. Progress in insect transcriptomics based on the next-generation sequencing technique. **Acta Entomologica Sinica**, v. 56, n. 12, p. 1489-1508, 2013. ISSN 0454-6296.

ZHANG, Y.-N. et al. Molecular identification and expression patterns of carboxylesterase genes based on transcriptome analysis of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, n. 4, p. 989-994, 2016. ISSN 1226-8615.

ZHANG, Z. et al. Depletion of juvenile hormone esterase extends larval growth in *Bombyx mori*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 81, p. 72-79, 2017. ISSN 0965-1748.

ZHAO, C. et al. Core RNAi machinery and gene knockdown in the emerald ash borer (*Agrilus planipennis*). **Journal of insect physiology**, v. 72, p. 70-78, 2015. ISSN 0022-1910.

ZHAO, J. et al. Silencing of juvenile hormone epoxide hydrolase gene (*Nljheh*) enhances short wing formation in a macropterous strain of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Journal of insect physiology**, v. 102, p. 18-26, 2017. ISSN 0022-1910.

ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of computational biology**, v. 12, n. 8, p. 1047-1064, 2005. ISSN 1066-5277.

ZHONG, H. et al. Comparative transcriptome analysis reveals host-associated differentiation in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 13778, 2017. ISSN 2045-2322.

ZHU-SALZMAN, K.; ZENG, R. Insect response to plant defensive protease inhibitors. **Annual review of entomology**, v. 60, p. 233-252, 2015. ISSN 0066-4170.

ZHU, F. et al. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. **Pest management science**, v. 67, n. 2, p. 175-182, 2011. ISSN 1526-4998.

ZHU, J.-Q. et al. Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsRNA of an insect-associated gene *EcR*. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38572, 2012. ISSN 1932-6203.

## Anexos

**Anexo I.** Componentes para a preparação de dieta artificial de *D. saccharalis* e *T. l. licus*. As quantidades mencionadas, são para um volume de 1L de água destilada.

Componente	Quantidade
Caseína	20 g
Extrato de levedura	10 g
Açúcar branco	60 g
Ácido ascórbico	10 g
Solução vitamínica	11 mL
Sais de Wesson	7,5 g
Colesterol	300 mg
Benzoato de sódio	300 mg
Cloreto de colina (50%)	2 mL
Agar	21,5 g

**Anexo II.** Sequências de DNA dos genes *jhe* identificados nos transcritomas de intestino de *D. saccharalis* (Dsjhe) e *T. l. licus* (Tljhe). Os fragmentos sublinhados fazem referência às regiões não traduzidas do gene. Os fragmentos em negrito fazem referência às sequências de dsRNA desenhadas para cada gene.

>Tljhe

AAATTACCATTTATTGTCAACTACCTCTCATTAAAAAACACAAGTGACAAAGTCAAGCTTGATAACATACAAGCTTACATAT  
ATAATACTATTTTACAATTTTACGATTGAACACAAGTGAGGGTATTTTCGTTTTTCATTTCAAAGTTTTATTAAGGATGCAT  
GTTGATAAAACACTACGCTTGCAGTAATACAAATAACATACTATACACATTGCTTTTGCTTTTGCAITCACGCAATATCTAA  
AATCAAGATGAGAATGAAATACTCGCATACAAACATGTATAACAATTGGCGTCAGTTTGACGTAAATTTATTATTATAAATCG  
AATCTTAAATTTTTAGAGACGACTTGTGTTGACTATGCGTTCAAATTATCATTACCAAGTCTCGGGTTAATGCCTGCGTTAGA  
AAAATGTTGCAATTAAGCACAATAATATTGTTGGGACTTGGAGCTATAATTCCTCATTGTTAATTCCTTATTGTACAAAAGT  
ATACGGGTTATTTATTGTATCCTAGGATAGGGATATATTGACTTTGAAATCTACGAAAATATCACGACAACCGAATCACTTTT  
TGCTCAAAAATTGGAGAAAGGCCACCACAACGCATGATGGCTAAAAGAAAATGTCGACAATATTTTCAAAAATTAAGATGGGGC  
TCAAATATGGTGGCCGAAACGTCCTGTGAATGTGTATTTATGATTCGTACAATTTAACGTGCAAATACGAGTACAATCGGTTT  
GCTGGTAGTCGCACATTACTAGCTAGTAGCTGCGCACCATCACGACTATACTACTCGCCGATAAACCGACGTGACGCGTAATC

ATCGATGTCAGATTACTTAAAGATCGCCCGTGACCTTCCCGAAAACGATTATATACAATGGAATATTTTATAATTTTGTGTTTGT  
TATTTAATTACAACAATTTATATATTTATAAATATATAACACACATATAACATAATATAAATGGAACAAAAAGAGAATATGAAC  
AGTTTGTATAGTATACTTCTAATATGCATATCACAGTTTATTAAGAAAAAATAGTTTGGTAAAGATTAACAACATATAGTGAT  
ATACTATATGTTATTGTGTTCTATTTTAAAAATGCATAATTCGACATTTGTTTGTAGTTTAAAAAATAAATTAATTCGAGTACAC  
ACATAGCTTFACTATTTTGAGACTAGTTCCTGACAAAATAAATTTGTTATCACTGTTTGTATGTCGTAGGAAACAAAACCAAG  
AGAATGCTCCAAAAATAATATAATTTTGTATATCATTTCTCTGCAGTTAATAAACTCTATTATATTGGCTTTACATTGGTATTA  
CCCCTTTTATATTTATGTTACGATAATTTTACAGTGTGACAAACGATGTTTCCAATAATTTTTCAGTGTGTTCTGCGAGC  
GCGCGCTCCGAGCCGATCGCGTGCAGCGTGCCTGCGCATCGACACCCGCTGGGTGTGCGGCCCTTCGCCGCTGGGGGAGAG  
ACGGCGCTGTGTATGCGAGCTTCCGCGCGTGCCTGACGCGAAACAACCCTCGGCGAGCTTCGGTTTCAAGAACTCCAACC  
GGCGGAACCTGGGATTACTTATACGATGCTACAGAAGAAGGCCCATTTGTCCTCAAAGGATGTGCTTACGGACGCATCA  
TGCAGCCACAAGGCATGAGTGAAGCTTGCATTCACGTAACATACACGTGCCATCAAAGCTCTGCCTGGATATAATCAGGG  
GAGGTGGTTCGCGAATTGCAATCACCTCATGACGCTGGCTATGAAGATGAAGACGAGAGAGGGAACGCGACAGGTTCTCT  
ATTTTGTGTTTACACGGAGGGGCTTCGCTTTCGGGTGAGGTGACGCCGACCTGCACGGCCCCGAGTATCTCGTTAGCAA  
AGGGGTCAATTGAATCACATTTAATTACAGGCTGAACGTGTTGCTTTCCTGTCGTTAACTCAAGTAGCATCCCCGGAATGC  
TGTTTTCGCTGACATGGTACGCTACTGCGCTGGGTGCAGAGAAACGCACACAACCTTGGCGGTGATCCGGATGACGTGACA  
CTAGGCGGGCAGAGCGCGGGTGTGTTCTGCACATTTGCTCCCTATCTGTCACCGAGGGCTGTTTAAAAGATTTATA  
ACAATGAGCGGTTTCGAGTTTCGACGTTCTCAATTTCCAAATTTCCGCAATTTATGCGACAATTTATGGCCAACTTATGTTA  
CTCGGCATCAACTCGACCGACCCTGAGGATATCCATCGGCAGCTTATTGATGTGCTCTTGAGAAAATATGGCAGTTAATAG  
CTTATTAATAGATCAAATTTGGTGTACAACTTCGTTCCCGTGTGAGTGTGCTCTCGGAGTAATAGCGATTGTGGAAGA  
CGATCCCGAAGTGCTAATAGCCAAAGCCGGGAAAGATATTCATTCATCGTGGGCTTCACTAACACAGGAGTGCAGAGTC  
TTTCGAAAGAGATTTGAAGAAAATAAACATTTGTCGCGCTCGAAGAAAAACACTTATTGCTCTTGCCACCGCTATTAGTGA  
TTCAATGCCTCCCGAAGTTGGGTTAACCTCGCAAAGAGGGTAGAGCAGAATTTTAAACGGAACACCGAGTCTTGACAAAT  
TCGTGTCGTTGTGTTCAAACGCTTACTTCAAATATCCTGCGATGAAGTTGCGGAACCTTAGAGCGGCTCACGATGGAGCT  
CCTGTGTTTTGTATCAGTTTCGATATCAAAGTGAACATAGTGTCTGCAAGAAGGTATCGGATTGAAGTATAAGGGT  
GCAGCGCATATTGAAGACTTAACTTATATATTCAGAGTGAACCTTATACTGGGAACCTCACAGTTCTGTTCCCTCCAAGGA  
ACCTAGATGATATGATGAAAGATTGGATGACGAAATTTTTCATAGACTTCATGTATTGCAGTGTCTACATGCAACGT  
CAACATCGTTTTCGGATGGCCACCAGTGGACAAAGACGAACTGCAGTATCAGAATAGAACTCCAAAGTTTTTCCATTT  
ACGGAGCCCTAAGAAAAGAGAAGGAGATGATACAATTTACGACAGCTTATAACCGGAACAGCTGAACCTGGTGGCAGT  
GGACCGAACAATGTTGTGTTGCGCGATCGCTACAGTGAATTTGCAAAAAGTCAGACTTCAAGTTCTATTTTATTGTAACGT  
TTTGTTCGAGTGTGCTAGTCTTATTGCAATTTATAAATAATTGTAAGGGACTTGTGATTTTGTGTCAGTCTTCAGGCGATG  
TATTATTTAGGGAACATTTTCATTGTTATATGATGATGAGTAGTTTGAACACTTTTATGTTTCTATAATACATATTATTATCCT  
ACATTGTGCGCATATAATCTGTGAAATGAAGAGGGAAAGATTTTGTATTTAGATTGATTAGAATTTCCGTTTATCCAAAGTG  
ATTTGCTCACCTGACGATATTATAATTTGATAGAGATCAAACTACAATGTTACAGATTGTGCTCTACTGATTACGACTGGG  
TTGCACTGGCCGACAGTTAAAATGTAATTTGAGACGCTTAAAAATATTATACGTTCTTTTAAATAGTTCTATAAAAATGTTT  
CTTAAAAATAAATAATATGCATTATAAGACTTGTGTTTGTATGTGATAGTACAAAGAGTATTTAGAATAAGTGTACTTGTGTA  
AATCTATTTTATATAAGTTTTGTGTGTGTACACGTAGCCAAATTTTTTATTCGTGTCCATTTTTGTGTATGTACAAATGGGT  
ATTCGTGCGTGTACTGATTTTTACTGATTTTTTAAATAATTCAAATAATAAATAATCGCAAAATGTGTGTGCAGAACTA  
ATAACGGAGTTTTATTTATTGATTTATATCCATCAGATTCACCTTTTTCATGTGTAATTTTATTTTATTTATAAATCAGGCA  
ACATTTTTTAAATTTCAAATCAATTTTTGACTAATTTACACAGTTCATATCCCTTTTGGCGAAGACCGATGCCATAGTTTTAAT  
TATTTCTATACTGGACATTTCTAATCCACGATGTTCTGCTATTGCGACTATTTCAACTTTTATGTTGCTGCGCTACACTTTTCT  
TTTTGCTTGTGTACCGAGCTGTACAATTTTGGTCCATTTTTGTTCTCTGCGCATTACACTCGCAAGTTGTGATCATCTCAAT  
TAAATTTTAAATTTTACTCTGCTTTTCAATAGGTTATGTCAAAATTTAAATCTTAAAAATTTATATAACCTAACTAGTGATAA  
CCTCGTCAACGTTTATCCAACACTTCTTGAGTTTAACTTAAAAACAACCGCTGCACTATATAAA

>Dsjhe

GATATCAATAAATATAGTATTTAAACATAAACCTTTTTAGTAAAAACTATATAGTTTTAAGTTGTCTTTGGAA

ATGGGCAGTTTTCGCGCGCTTTTATTTCTTCGTTTCTTTCGACCCGCTTTTGTGTTGGATAAAAACACGTATCGTAACCACAAAAT  
ATGGCGAAATAGAAGGTTATTTAGCGTCAAACGAATGTATTATGAATATTTGGGTATAAGATATGGATTACCTGTAAAATTC  
AGATCACCAGCAAAACCTCCTTACATACTGAAGTCTACAAAGCTGACAATCCAGTAGTTATCTGTCCACAATTTCCATGCAA  
CGATCCTTTAGCTGTGCCAAGCGAAAACGAAGACTGCTTAGTCTCAACATCTACTCGCCAAGCGACGTTCAAAAATACAACAC  
TTCCAGTGATCGTATTCCTTACGGTGGCGGTTTCGGCGTTGGCTGGAAGTCCAGGCATTTATGGTCTCAATACCTAGTCA  
GTCATGGAATTGTAGTTGTCACCATCAATTACAGACTTAATGCGTATGGTTTCTCAATTTGGGAATAAAAAGAAGCACAGGA  
AATGCGGGCTTGAAGACATTAGAGCAGCGTTGAGGTGGATACAGGAGAACATTAGAAGTTTTAATGGCGACCCTGAT  
AACGTAACGTATTGGGCCAAGGCAGTGGTGGTATCGCGGCAATGATTTAACATTATCCGAGTCTACTAAAGGTTTA  
TTCCATAGAGTTATTTCTGAAAGTGGTACTATGTTTGGCCACATTCATTTGATATAGACCCCTTGAAGTCTGCGAGTC  
AAGTAGTAAGTCTTTAGAAGTAATCTCTTCAAGCCCTAATGAACCTTTAGAAGTATTCTCAGAAACCGCTGTAAAGAA  
GTTAGAAGAAGCAATTTCTAGACAGATGAATGCTAAAACCTGTATTCGTGCCATCGTCCGAGGAAGAGTTT