

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

RNAi para o controle de *Tuta absoluta* em tomateiro

Roberto de Almeida Camargo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Programa: Internacional Biologia Celular e
Molecular Vegetal

**Piracicaba
2014**

Roberto de Almeida Camargo
Biólogo

RNAi para o controle de *Tuta absoluta* em tomateiro

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ANTONIO VARGAS DE OLIVEIRA FIGUEIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Programa: Internacional Biologia Celular e
Molecular Vegetal

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Camargo, Roberto de Almeida

RNAi para o controle de *Tuta absoluta* em tomateiro / Roberto de Almeida
Camargo.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - -
Piracicaba, 2014.

110 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. RNAi 2. Tomateiro 3. *Tuta absoluta* 4. Transformação genética 5. Silenciamento
gênico I. Título

CDD 635.642
C172r

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

À todos os produtores de tomate e quiçá alguns cientistas, dedico...

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e à Universidade de São Paulo pelo suporte ao desenvolvimento deste trabalho;

À CAPES pelo apoio financeiro no Brasil e nos EUA;

Ao Professor Dr. Antonio Figueira pela ORIENTAÇÃO, acho que a palavra já diz tudo; também por me aceitar como aluno no meio do caminho;

Ao Prof. Eric Lam, à Prof^a Rong Di e a Universidade Rutgers, pela oportunidade única de intercâmbio; ao programa IGERT do NSF (National Science Foundation) pela bolsa nos EUA;

Ao Prof. Henrique Marques-Souza da UNICAMP pela co-orientação e junto com o pós-doc Joni Lima que foram os idealizadores deste projeto;

Ao Prof. José Roberto Parra do Departamento de Entomologia da ESALQ e sua equipe pela colaboração;

À Prof^a Helaine Carrer por me aceitar no início na pós-graduação;

Aos pesquisadores Roberto Herai e Udi Zelzion pela ajuda nas análises de bioinformática; ao Walter Bernardi da empresa Bayer pelas pupas de *Tuta absoluta* cedidas;

À toda minha família, especialmente Pai, Mãe, Irmã, Sobrinhos, Avó e Madrinha pelo apoio incondicional sempre;

Ao meu amor, Mariana, pela ajuda em todos os momentos (e foram muitos!), inclusive na elaboração desta;

À toda equipe e alunos do Laboratório de Melhoramento de Plantas que tive o prazer de conviver nestes três anos de LAMP; um agradecimento especial para a técnica de laboratório Inês Possignolo e a aluna de iniciação científica Isabella Posignollo pela ajuda nos experimentos de transformação genética; também a aluna de iniciação científica Luana pela colaboração com as clonagens;

À todas as amigadas construídas durante estes 4 anos e meio em Piracicaba;

“Cria em si, mas não duvide sempre dos outros”

Machado de Assis

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 RNAi.....	19
2.2 RNAi para o controle de pragas.....	19
2.3 Tomateiro e <i>Tuta absoluta</i>	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Criação de <i>Tuta absoluta</i>	33
3.2 Material vegetal.....	33
3.3 Clonagem de genes candidatos.....	33
3.3.1 Escolha de genes candidatos e desenho de primers.....	33
3.3.2 Extração de RNA de <i>Tuta absoluta</i>	33
3.3.3 Tratamento com DNase I.....	35
3.3.4 Síntese de cDNA.....	35
3.3.5 Amplificação dos genes alvos e inserção em vetor de clonagem.....	36
3.4 Ensaio de RNAi.....	36
3.4.1 Síntese de dsRNA a partir dos genes alvos clonados.....	37
3.4.2 Ensaio de fornecimento de RNAi a <i>Tuta absoluta</i>	37
3.4.3 Extração de RNA e síntese de cDNA de <i>T. absoluta</i> para análise de expressão gênica.....	38
3.4.4 Análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR).....	40
3.5 Transformação genética do tomateiro ‘Micro-Tom’.....	41
3.5.1 Construção dos vetores para silenciamento em plantas.....	41
3.5.2 Construção dos vetores para silenciamento em plantas.....	43
3.5.3 Análise das plantas regenerantes.....	45
3.5.3.1 Extração de RNA e DNA.....	45
3.5.3.2 Confirmação da transformação por PCR.....	45
3.5.3.3 RT-PCR gene específica.....	45
3.5.3.4 <i>Stem loop pulsed</i> RT-PCR.....	46
3.5.3.5 Experimentos de herbivoria.....	47
3.6 Caracterização do transcrito de <i>T. absoluta</i> por RNA-seq.....	48

3.6.1 Extração de RNA de <i>T. absoluta</i> para o sequenciamento massivo.....	48
3.6.2 Análises de bioinformática do RNA-seq.....	48
3.6.2.1 Montagem de transcrito de referência a partir dos dados de sequenciamento RNAseq.....	48
3.6.2.2 Análise de expressão gênica diferencial.....	49
3.6.2.3 Agrupamento (<i>clustering</i>) das amostras.....	50
3.6.3 Validação da expressão diferencial entre as fases de desenvolvimento (bibliotecas)....	50
3.7 Novos genes alvos de silenciamento a partir do transcrito gerado.....	52
3.7.1 Escolha dos novos alvos.....	52
3.7.2 Clonagem dos novos genes candidatos.....	53
3.8 Ensaios de RNAi.....	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1 Escolha inicial de genes alvos para o silenciamento em <i>T. Absoluta</i>	55
4.2 Clonagem dos genes alvos.....	55
4.3 Produção de dsRNA <i>in vitro</i>	57
4.4 Avaliação do silenciamento gênico por dsRNA em <i>Tuta absoluta</i> fornecido por dieta....	58
4.5 Construção de vetores para a produção de plantas transgênicas expressando produtos de silenciamento em <i>T. Absoluta</i>	64
4.6 Produção de tomateiro transgênico.....	66
4.7 Ensaio preliminar de herbivoria em plantas transgênicas expressando RNAi.....	70
4.8 Análise transcritômica massal de diversas fases de desenvolvimento de <i>Tuta absoluta</i>	72
4.8.1 <i>De novo assembly</i> , estimativa da expressão gênica e anotação.....	72
4.8.2 Análise da expressão gênica diferencial entre as fases de desenvolvimento.....	75
4.8.3 Validação da expressão diferencial entre as fases de desenvolvimento (bibliotecas)....	78
4.8.4 Agrupamento (<i>clustering</i>) das sequências das bibliotecas.....	84
4.9 Novos genes alvos.....	86
4.9.1 Seleção dos novos genes alvos.....	86
4.9.2 Clonagem.....	86
4.9.3 Síntese de dsRNA <i>in vitro</i>	87
4.9.4 Ensaio de alimentação.....	87
5 CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXOS.....	107

RESUMO

RNAi para o controle de *Tuta absoluta* em tomateiro

Desde seu descobrimento, o fenômeno de silenciamento gênico por RNA (RNAi) rapidamente se tornou uma técnica amplamente estudada e utilizada nos mais diversos aspectos da biologia molecular. Uma destas possibilidades é sua aplicação no campo da entomologia agrícola, mais especificamente para o controle de insetos-praga como uma alternativa de alta eficiência, especificidade e com impacto ambiental reduzido. Por meio da geração de plantas transgênicas expressando RNAi para genes essenciais de insetos-praga específicos, a ingestão destas moléculas de RNAi pelo inseto mediante herbivoria pode resultar no silenciamento do respectivo gene, resultando em fenótipos que podem variar entre perda de apetite, infertilidade ou até a morte. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo provar a viabilidade de aplicação desta técnica para a interação Tomateiro x *Tuta absoluta*, cultura de grande expressão econômica e social no mercado nacional e internacional e que é amplamente atacada por esta praga, com prejuízos que podem alcançar a ordem dos 100% da produção. Por meio da clonagem de genes ortólogos essenciais descritos na literatura e de genes altamente expressos nos primeiros estádios larvais, após a caracterização transcriptômica em escala do inseto, foram realizados ensaios de alimentação contendo moléculas de dsRNAs que possuíam estes genes como alvo. Também, foi realizado a transformação genética de tomateiro cultivar “Micro-Tom” com dois destes genes (V-ATPase A e Arginina kinase) para a realização de ensaios de herbivoria. Com os resultados obtidos nestes experimentos, foram mostradas sólidas evidências da viabilidade da técnica de RNAi para o controle de *Tuta absoluta*, evidenciado pelo silenciamento gênico específico observado no inseto e consequentemente os efeitos nocivos deste silenciamento.

Palavras-chave: RNAi; Tomateiro; *Tuta absoluta*; Transformação genética; Silenciamento gênico

ABSTRACT

RNAi for the control of *Tuta absoluta* in tomato plants

Since their discovery, the phenomenon of gene silencing by RNA (RNAi) has rapidly become a widely studied and used technique in the molecular biological field. One of these possible applications is in the entomology field, more specifically for the control of insect pests, as a high efficiency, specificity and with reduced environmental impact alternative. Through the generation of transgenic plants expressing dsRNA targeting essential insect genes, their ingestion by the insect and consequently the uptake of the silencing RNA, may result in specific gene silencing, resulting in a variety of phenotypes that can range from loss of appetite, infertility to death. In this context, this study aimed to prove the feasibility of this technique to control tomato leaf miner (*Tuta absoluta*) in tomatoes plant, a major crop worldwide and seriously attacked by this pest, with losses that can reach 100%. For the present work, orthologous genes from successfully cases of insect gene silencing described in the literature, was selected together with highly expressed genes in the early larval stages of *T. absoluta*, chosen after the insect molecular characterization and used in feeding assays with dsRNAs molecules to targeted these genes. Also, genetic transformation of the “Micro-Tom” tomato cultivar with two of these genes (V-ATPase and Arginine kinase) was conducted for testing in an herbivore assay. With these two approaches was possible to get solid evidences of the feasibility of the RNAi technique to control this insect, evidenced by specific gene silencing observed and its consequent effect on pest phenotype.

Keywords: RNAi; *Tuta absoluta*; Tomato; Gene silencing; Transgenic plants

1 INTRODUÇÃO

As moléculas de ácidos ribonucleicos de fita dupla (dsRNAs, do inglês “double strand ribonucleic acid”) provavelmente são tão antigas quanto a vida na Terra; porém a identificação científica desta forma de RNA só ocorreu a partir de meados da década de 1950. O mesmo tipo de pareamento de bases que mantém cadeias de DNA unidas (WATSON; CRICK, 1953) foi reconhecido em moléculas de RNA apenas alguns anos após a elucidação da dupla fita de DNA (RICH; DAVIES, 1956). Quando duas fitas de RNA possuem regiões complementares extensas, estas podem se associar em uma estrutura de natureza similar à dupla hélice observada em uma molécula de DNA (SPENCER et al., 1962).

No início dos anos 1960, diversos estudos revelaram a existência de dsRNA em sistemas biológicos (BALTIMORE; BECKER; DARNELL, 1964; MONTAGNIER; SANDERS, 1963), e curiosamente, todos estes sistemas inicialmente descobertos envolviam infecções virais, levando a uma teoria de que os vírus (de RNA) replicavam seu material genético por meio de um dsRNA intermediário. Tal observação contrariava completamente a teoria sobre o fluxo da informação celular que se estabelecia naquela época, onde a informação era “armazenada” em uma dupla fita de DNA e “transmitida” em RNA de fita simples, chamado de Dogma Central da Biologia Molecular, mas ao mesmo tempo apresentava um papel chave para o dsRNA na replicação viral (WEISSMANN et al., 1963; BALTIMORE; BECKER; DARNELL, 1964). Mas foi somente na década de 1990 que diversos grupos de pesquisadores começaram a desvendar a mais extraordinária função que estas moléculas de RNA exerciam na maquinaria celular, o que alguns anos mais tarde veio a ser chamado de silenciamento gênico por RNA ou RNA de interferência (RNAi, do inglês “RNA interference”; FIRE et al., 1998).

Em organismos derivados, o silenciamento gênico por RNA se ramificou em diversos mecanismos biológicos (de impossível predição de toda sua extensão), que vão desde a defesa contra patógenos e elementos de transposição, atuando na regulação da expressão gênica, ao controle da estrutura do DNA celular e sua cromatina associada (MELLO; CONTE JÚNIOR, 2004). A descoberta do silenciamento por RNA modificou completamente a visão que se tinha sobre esta molécula, tornando-a elemento central na regulação das células eucarióticas (BALCOUMBE, 2004).

Logo após as primeiras descobertas que moléculas de dsRNA poderiam ser usadas para silenciar determinados genes, diversos métodos baseados em RNAi foram desenvolvidos e revolucionaram o campo da genômica funcional, devido à facilidade de obtenção de

fenótipos de perda de função (*knock-out* e *knock down*) pela técnica de RNAi, quando comparada aos métodos tradicionais de obtenção de mutantes (PERRIMOM; NI; PERKINS, 2010). Inicialmente utilizada para silenciar genes individualmente, esta técnica já foi explorada em escala global com a produção de bibliotecas de RNAi para o silenciamento de quase todas as sequências transcritas do genoma de uma variedade de organismos, desde os considerados modelos clássicos como o nematóide *Caenorhabditis elegans* e a *Drosophila* até células humanas (BOUTROS; AHRINGER, 2008), revolucionando assim a biologia experimental de diversos organismos (HANNON, 2002).

Uma possibilidade promissora de aplicação da técnica de RNAi está no campo da entomologia, mas especificamente no controle de insetos considerados pragas agrícolas. A partir da manipulação genética de plantas hospedeiras para expressarem moléculas de RNAi de genes essenciais ao inseto, a simples ingestão desta planta e conseqüentemente das moléculas de RNAi, poderia causar efeitos nocivos ao inseto como o retardo no desenvolvimento ou até a morte e portanto conferir resistência a planta (GORDON; WATERHOUSE, 2007). O marco desta possibilidade ocorreu quando dois artigos foram publicados simultaneamente por dois grupos de pesquisadores que conseguiram demonstrar a aplicabilidade da técnica de RNAi para o controle de duas espécies de *Diabrotica* (Coleoptera) (BAUM et al., 2007) e de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera) (MAO et al., 2007). Desde então, o uso da tecnologia se expandiu significativamente, atingindo diversas espécies de insetos (HUVENNE; SMAGHE, 2010).

Neste contexto, uma praga de origem sulamericana, a *Tuta absoluta* (Lepidoptera), altamente prejudicial ao tomateiro (*Solanum lycopersicum*), apresenta potencial de ser empregada como prova de conceito para o uso de RNAi em culturas tropicais. Esta pequena mariposa, que se alimenta majoritariamente de plantas do gênero *Solanum*, ganhou destaque mundial a partir de 2007, ao ser introduzida e se espalhar por toda a Europa, promovendo inúmeras perdas para os produtores de tomate. Além de provocar perdas imensuráveis para os produtores de tomate, a *T. absoluta* é um inseto pouco caracterizado molecularmente, dispondo sequências nucleotídicas apenas para 5 genes em bancos de dados mundiais públicos (Genbank do NCBI, Outubro 2013).

Diante deste cenário, o presente trabalho teve como objetivos testar a viabilidade da técnica de RNAi como prova de conceito para o controle da “traça do tomateiro” por meio de experimentos de alimentação e da transformação genética do tomateiro da cultivar ‘Micro-tom’, bem como caracterizar o transcrito do inseto praga por meio do sequenciamento massivo de transcritos (RNA-seq), com o intuito de fornecer informações para busca de

potenciais genes-alvo de silenciamento, e gerar um banco de dados de sequências expressas desta espécie.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RNAi

O termo “mundo RNA” foi primeiramente cunhado em alusão a um estágio de evolução da vida na Terra, cerca de 4 bilhões de anos atrás, quando se presume que o RNA era o material genético que catalisou o surgimento da vida (GILBERT, 1986). Atualmente há um processo vivo e em pleno desenvolvimento dentro da maquinaria celular ao qual podemos chamar de “mundo RNA”, o processo de RNAi (MELLO; CONTE JÚNIOR, 2004).

Em uma tentativa de intensificar a cor púrpura de flores de petúnias, dois grupos de pesquisadores inseriram cópias extras de genes responsáveis pela pigmentação. Como resultado, ao invés de conseguirem flores de coloração mais intensa, obtiveram flores variegadas ou até completamente brancas (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990; KROLL et al., 1990). Estas observações, provavelmente as primeiras manifestações de silenciamento por RNA, foram chamadas na época de ‘co-supressão’, pois tanto as cópias extras quanto os genes endógenos foram silenciados. Cerca de 8 anos depois, estudando o nematóide *Caenorhabditis elegans*, um grupo de pesquisadores descobriu que o responsável pelo desencadeamento do processo de silenciamento era um dsRNA, e o termo RNAi foi proposto (FIRE et al., 1998). Tal descoberta rendeu em 2006, o prêmio Nobel de Fisiologia a Andrew Z. Fire e Craig C. Mello, dois destes pesquisadores (nobelprize.org).

O fenômeno de silenciamento gênico baseia-se na presença de moléculas de pequenos RNAs não codantes (ncRNA, do inglês “non-coding RNA”), geralmente produto da clivagem de moléculas maiores de dsRNA, com sequências homólogas a genes endógenos de um organismo. Está presente em fungos, quando é chamado de *quelling*; em plantas, chamado de PTGS (do inglês “post transcriptional gene silence”) e em animais, chamado de RNAi (FAGARD et al., 2000); porém, todos compartilham um mecanismo determinante comum que indica uma origem remota em um ancestral comum de fungos, plantas e animais (FAGARD et al., 2000)

O que define um pequeno RNA silenciador é o seu tamanho, de 20 a 30 pares de bases e sua associação com uma das proteínas da família Argonauta; porém distintas classes de pequenos RNAs são responsáveis por um diverso e complexo esquema de regulação gênica (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009). Embora diversas classes de pequenos RNAs tenham sido descobertas, vários aspectos de suas origens, estruturas, proteínas efetoras associadas e funções biológicas levaram ao reconhecimento de três classes principais: siRNA (do inglês

“short interfering RNA”), miRNA (“micro RNA”) e piRNA (“piwi interacting RNA”) (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009).

Inicialmente, os siRNAs foram caracterizados como derivados de moléculas precursoras de dsRNA longo, linear, perfeitamente complementar, introduzido diretamente no citoplasma das células ou absorvidos do ambiente (MELLO; CONTE JUNIOR, 2004). Esses dsRNA são processados em siRNAs que dirigem o silenciamento (MEISTER; TULSCH, 2004). Como dsRNAs foram originalmente observados no silenciamento induzido por vírus ou por transformação genética, foi-lhe atribuído um papel natural de defesa (MELLO; CONTE JUNIOR, 2004). Alguns anos depois, centrômeros, transposons e outras sequências repetitivas foram reconhecidas como fontes de siRNAs (LIPPMAN; MARTIENSSSEN, 2004), e pouco depois, estudos funcionais em plantas levaram ao descobrimento de *ta*-siRNAs (*trans acting siRNAs*) que são produzidos pelo corte de transcritos específicos e regulam um grupo restrito de genes (VASQUEZ et al., 2004). Recentemente, outras fontes de siRNA endógenos (endo-siRNA) foram identificados como RNA mensageiros convergentes, fontes naturais de moléculas senso e antisenso, tais como pseudogenes e o mRNA de seu gene relativo, e RNAs do tipo *hairpin* (hpRNA) (GOLDEN: GERBASI; SONTHEIMER, 2008), evidenciando que as fontes de siRNAs não são somente exógenas (exo-siRNA).

Os miRNAs pertencem à uma classe de sRNA endógenos, com 20-24 nucleotídeos, altamente abundantes em plantas e animais (BARTEL, 2004). Sua biossíntese é iniciada pela transcrição dos genes MIR por meio da RNA polimerase II. Este transcrito primário, também chamado de precursor (ou pri-miRNA) é um RNA fita simples (ssRNA), longo e poliadenilado, que, por meio do pareamento de bases de regiões complementares, forma uma estrutura secundária de dsRNA do tipo “hairpin” ou grampo (BARTEL, 2004). Esta molécula de pri-miRNA é processada no núcleo através da ação de uma enzima do tipo RNase classe III, chamada de *Dicer* (DCL1) em plantas e *Drosha* nos animais, que a corta em uma molécula de dsRNA de cerca de 60-70 pares de bases, chamado de pre-miRNA, que então é exportado para o citoplasma através da proteína HASTY em plantas, ortóloga da proteína ‘Exportina 5’ (BARTEL, 2004).

Já os piRNAs pertencem a uma classe de moléculas de RNAi mais recentemente descobertas, e sua função mais bem elucidada está em assegurar a estabilidade de células germinativas ao atuar no silenciamento de transposons (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009). Primeiramente observado em *Drosophila*, atuando no silenciamento de sequências repetitivas, (ARAVIN et al., 2001), esta classe de pequenos RNAs foi inicialmente chamada de siRNAs associados a sequências repetitivas (ra-siRNA, do inglês “repeat associated siRNA”). Mais

tarde, com a descoberta de uma classe destes sRNAs não associados com sequências repetitivas, foi renomeada para piRNA (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009). Os piRNAs, diferentemente dos siRNAs e miRNAs, possuem um RNA fita simples como precursor e não requerem a ação da proteína *Dicer* para sua biossíntese; eles podem ser um pouco mais longos atingindo até 30 pares de base, e se associam com uma subfamília dentro das *Argonautas* chamada de *Piwi* (VAGIN et al., 2006).

O processamento das moléculas de RNAi no citoplasma é um processo gradual catalisado por uma endonuclease do tipo RNase III específica para dsRNA, denominada *Dicer* (com exceção dos piRNA), que é uma enzima que apresenta como característica principal a presença de dois domínios, um com atividade catalítica (RNaseIII) e outro domínio de ligação ao dsRNA (dsRBD). Tal enzima se associa ao dsRNA no citoplasma e é responsável pelo processamento do dsRNA em fragmentos de cerca de 21-24 pares de base (MEISTER; TULSCH, 2004). Estas moléculas menores são então associadas a um complexo ribonucleoproteico com atividade nuclease denominado RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*); todo complexo RISC possui um membro da família de proteínas chamada *Argonauta*, que possui como características marcantes um domínio de ligação ao RNA e um domínio de atividade nuclease (CARMELL et al., 2002). Neste complexo, uma das fitas do dsRNA é eliminada e a fita remanescente guia o reconhecimento para degradação (ou inibição) sequência específica do RNA mensageiro complementar (MARTINEZ et al., 2002) (Figura 1).

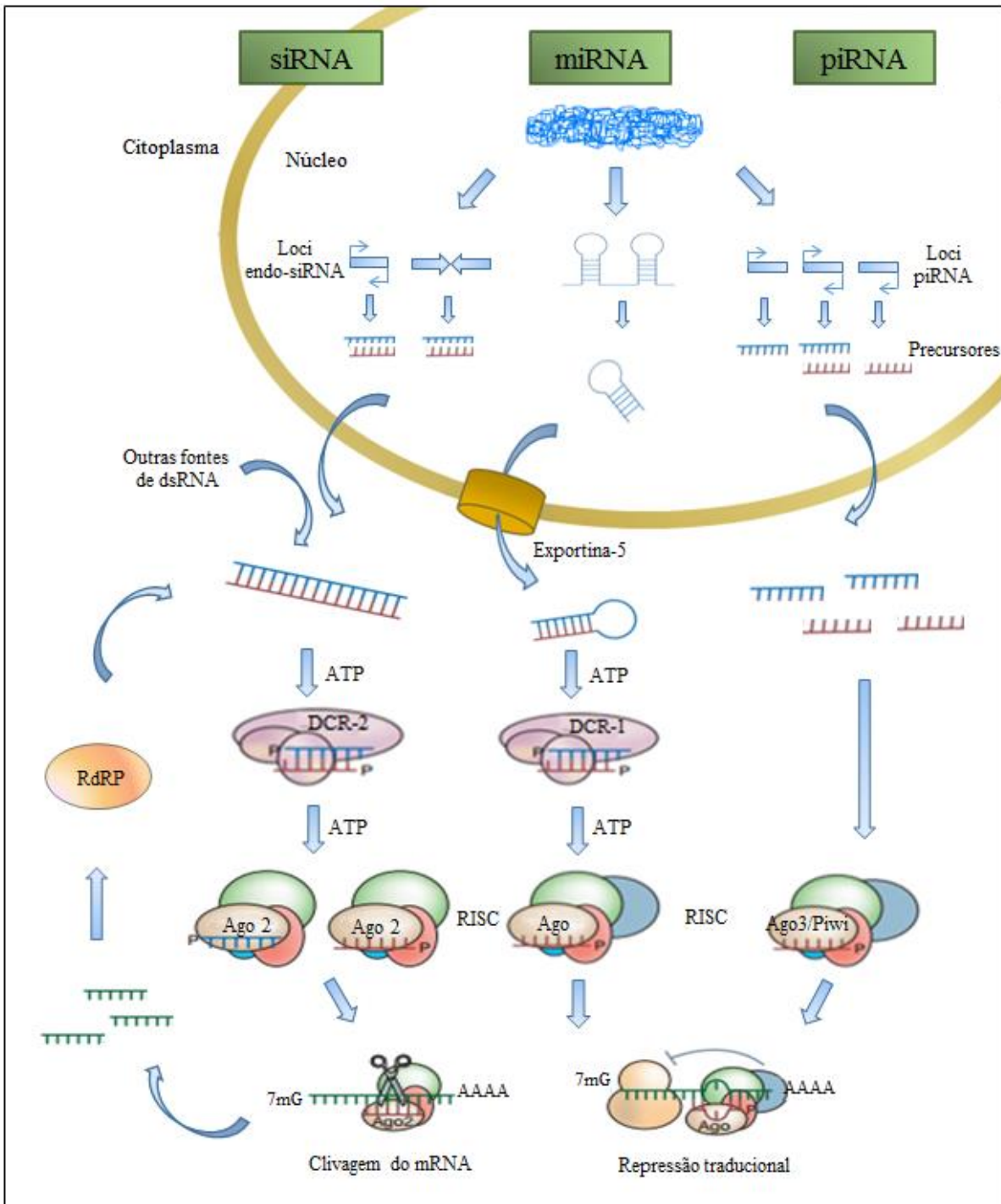


Figure 1 - Esquema ilustrativo das vias de silenciamento por RNAi. DCR proteínas *Dicer*, AGO proteínas Argonauta, RISC 'RNA induced silencing complex', Piwi proteínas piwi, RdRP RNA polimerase RNA dependente

Uma das características mais marcantes do RNAi é sua potência, pois apenas poucas moléculas de dsRNA por célula pode induzir uma resposta robusta (MELLO; CONTE JUNIOR, 2004). Em alguns organismos, como plantas e *C. elegans*, as primeiras moléculas de dsRNA (primárias) podem induzir a síntese de moléculas de siRNAs secundárias através

de uma enzima ‘RNA polimerase RNA-dependente’ (RdRP, do inglês “RNA-dependent RNA polymerase”) (SIJEN et al., 2001) (Figura 1). O “pool” de siRNA secundário é capaz de aumentar e manter ou até mesmo disseminar o sinal de silenciamento através do organismo em um mecanismo chamado de amplificação (SIJEN et al., 2001).

As observações iniciais em *C. elegans* eram consistentes com um dsRNA induzindo silenciamento gênico pós transcricional (PTGS, do inglês “post transcriptional gene silence”), e este modelo de silenciamento também fora observado em experimentos com plantas expostas a dsDNA (CARVALHO et al., 1992), e com experimentos com vírus de RNA infectando plantas em que seus transcritos eram alvos de dsRNA, sem um efeito aparente na taxa de transcrição (JONES; RATCLIFF; BAULCOME, 2001). Esses estudos levaram a hipótese de que RNAi induziria a degradação do mRNA homólogo, confirmado posteriormente por análises bioquímicas (HANNON, 2002). Porém a maquinaria de interferência por RNA opera em diversos níveis afetando a expressão gênica de outras maneiras. Em plantas, a exposição a um dsDNA pode induzir a metilação de sequências homólogas no genoma (WASSENEGGER et al., 1994), e se esta região for um promotor, o gene em questão pode ser transcricionalmente silenciado (METTE et al., 2000). Outros estudos ainda sugerem que maquinaria de RNAi afeta a expressão gênica no nível de estrutura de cromatina em *Drosophila*, *C. elegans* e em fungos (PAL-BHADRA; BHADRA; BIRCHLER, 2002; TABARA et al., 1999; DUDLEY; LABBE; GOLDSTEIN, 2002). Também em *C. elegans*, esta maquinaria parece agir no nível de síntese de proteínas (WIGHTMAN; HÁ; RUVKUN, 1993).

Logo após a descoberta do fenômeno de silenciamento gênico por RNAi, vários métodos baseados em RNAi foram desenvolvidos, inicialmente utilizados para silenciar genes de interesse individualmente. A utilização deste método em larga escala revolucionou o campo da genômica funcional, devido à sua relativa facilidade, e, mais significativamente, porque RNAi, diferentemente dos métodos tradicionais de *screening* genético, fornece uma poderosa abordagem de genética reversa, especialmente para os organismos de difícil manipulação genética, como os mamíferos. Com a conclusão do sequenciamento de diversos genomas, os métodos de análises baseados em RNAi se tornaram mais poderosos, com a utilização de bibliotecas de RNAi para silenciar a maior parte dos genes em seus genomas; foi possível a utilização desta técnica em escala global no genoma de organismos modelos, como *C. elegans* e *Drosophila*, cultura de células humanas e até em organismos os quais as técnicas genéticas eram pouco desenvolvidas como a planária e mosquitos (PERRIMOM; NI; PERKINS, 2010; BOUTROS; AHRINGER, 2008).

Basicamente, o silenciamento por RNA pode ser obtido *in vivo* por meio da introdução do dsRNA no organismo por meio da microinjeções em ovos, ou em regiões específicas do organismo, ou por intermédio da alimentação, pela adição de dsRNA às dietas ou pela ingestão de bactérias que expressem as sequências de dsRNA (PERRIMOM; NI; PERKINS, 2010). Em alguns organismos, o mecanismo de silenciamento gênico possui um caráter sistêmico, podendo ser induzido em uma determinada célula e transmitido para células vizinhas, como por exemplo em *C. elegans* através de proteínas transmembranas chamadas de SID-1 e SID-2 (do inglês “systemic RNAi defective”; WINSTON; MOLODOWITCH; HUNTER, 2002; WINSTON et al., 2007). Também em *C. elegans*, um potente sinal de silenciamento pode ser passado através de células germinativas e transmitido para diversas gerações (FIRE et al., 1998; GRISHOK; TABARA; MELLO, 2000).

Nos últimos 15 anos, poucas áreas da biologia foram transformadas tão drasticamente quanto a biologia molecular do RNA, com o descobrimento dos pequenos RNAs não codificantes que estão envolvidos na regulação de genes e genomas, que pode ocorrer nos mais importantes níveis de suas funções, tais como estrutura da cromatina, segregação do cromossomo, transcrição, tradução, processamento e estabilidade do RNA (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009). A história dos pequenos RNAs silenciadores torna qualquer predição obscura, já que a descrição de novas classes e funções para estas moléculas ocorrem em um ritmo alucinante forçando a reavaliação dos modelos e fatos previamente estabelecidos (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009).

2.2 RNAi para o controle de pragas

A técnica de RNAi tem sido amplamente utilizada no campo da biologia do desenvolvimento e da entomologia. Apesar de variações quanto à presença ou funcionalidade de determinados componentes deste mecanismo, o princípio de silenciamento é muito semelhante em todos os casos estudados. De um modo geral, os trabalhos utilizam esta técnica, principalmente em insetos modelos, tais como *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum* e *Bombyx mori*, para a caracterização dos mecanismos de ação do RNAi, como por exemplo a elucidação da função da proteína *Dicer* (HAMMOND et al., 2000) e do complexo RISC (LIU et al., 2003) ambos em *Drosophila*; a identificação de um silenciamento sistêmico e duradouro após injeção de dsRNA em larvas de *Tribolium* (TOMOYASU; DENELL, 2004), e também para o estudo da função e regulação gênica, como por exemplo a análise global dos genes envolvidos na morfologia celular em *Drosophila* (KIGER et al., 2003); a elucidação do papel de um importante gene envolvido no desenvolvimento no besouro *Tribolium castaneum*

(MARQUES-SOUZA et al., 2008); e a análise da via de biossíntese de feromônio na mariposa *Bombyx mori* (OHNISHI; HULL; MATSUMOTO, 2006).

Por proporcionar uma ação eficiente e gene-espécie específica, a aplicação da técnica de silenciamento gênico por RNAi para o controle de pragas, tem se tornado uma grande promessa de um controle com alta eficiência com um impacto ambiental muito inferior às técnicas antecessoras (PRICE; GATEHOUSE, 2008).

Em insetos, uma maneira adequada de fornecimento de dsRNA pode influenciar consideravelmente a aplicabilidade da técnica, pois o processo de silenciamento gênico necessita da ação da molécula efetora dentro das células do organismo alvo. Portanto, o fator limitante para o sucesso da aplicação está vinculado a absorção deste RNA nas células-alvo e sua disseminação pelo organismo (HUVENNE; SMAGHE, 2010). Sendo assim, pode-se distinguir dois tipos de RNAi: ‘RNAi celular autônomo’, quando o dsRNA é inserido ou produzido pela célula e exerce o silenciamento somente naquela célula; e ‘RNAi celular não autônomo’, quando este sinal de silenciamento é transmitido para as células adjacentes (WHANGBO; HUNTER, 2008; HUVENNE; SMAGHE, 2010). No caso do RNAi celular não autônomo, a primeira etapa envolve um RNAi ambiental, onde as células que estão em contato com o dsRNA precisam absorver estas moléculas do ambiente (por exemplo, as células epiteliais do aparelho digestivo após ingestão), e depois pode ou não ocorrer um RNAi sistêmico, onde o sinal se espalha para o resto do organismo (WHANGBO; HUNTER, 2008). Neste caso, dois mecanismos potenciais para a absorção e transporte de dsRNA foram elucidados, sendo eles os canais de proteínas transmembranas chamados de SID (WINSTON; MOLODOWITCH; HUNTER, 2002) e a absorção por endocitose (ULVILLA et al., 2006).

As primeiras aplicações do silenciamento gênico por RNAi no controle de pragas foram publicadas simultaneamente por Baum et al. (2007) e Mao et al. (2007). Baum et al. (2007) testaram primeiro a sensibilidade das larvas do coleóptero *Diabrotica virgifera virgifera*, importante praga do milho, à ingestão de dsRNAs relativo a diversos genes e em distintas concentrações, em um ensaio de alimentação de 12 dias com dieta artificial com o objetivo de selecionar um vasto repertório de genes essenciais ao inseto. De todos os genes testados (295), a ingestão de dsRNA para 125 genes resultou em um significativo retardo do crescimento ou mortalidade das larvas. Este silenciamento gênico específico para os genes em questão foi confirmado por meio de RT-PCR quantitativo. Dentre eles, o gene que codifica a subunidade A da ATPase vacuolar foi escolhido para a transformação de plantas de milho expressando dsRNA homólogos ao gene e submetidas ao ataque de *Diabrotica virgifera virgifera* (BAUM et al., 2007). Uma vez transformadas e expressando o dsRNA da ATPase,

as plantas apresentaram níveis consideráveis de proteção quando comparadas com a planta controle, mostrando a viabilidade da técnica. Em um outro ensaio, os mesmos dsRNAs utilizados no experimento anterior, ou seja homólogos a genes de *Diabrotica virgifera virgifera*, foram testados em duas outras espécies, e o resultado foi uma queda significativa na taxa de mortalidade proporcional a diminuição na homologia das sequências gênicas ortólogas, mostrando que o silenciamento pode ser altamente espécie-específico (BAUM et al., 2007).

No trabalho de Mao et al. (2007) o alvo do RNAi não foi um gene necessário para a homeostase do inseto, mas sim uma proteína que confere resistência a um terpenóide presente no algodoeiro chamado de gossipol. Neste trabalho, os autores demonstraram que a tolerância das larvas de *Helicoverpa armigera* ao gossipol é devida à atividade de um gene que codifica uma proteína P450 monooxigenase. Ao alimentar as larvas com dieta artificial de plantas de tabaco e de *Arabidopsis* expressando o dsRNA do gene em questão, foi observado uma redução significativa na expressão deste gene. Quando essas larvas foram alimentadas em dieta contendo gossipol, foi observado um significativo retardamento do crescimento. Em outro trabalho deste mesmo grupo (MAO et al., 2011) foram geradas plantas transgênicas de algodão expressando o dsRNA do gene de P450 monooxigenase, e estas plantas apresentaram uma maior resistência a *Helicoverpa armigera*, provando novamente a eficiência da técnica.

De uma maneira geral, trabalhos sobre o uso da técnica de silenciamento gênico para controlar pragas utilizam dois métodos de introdução do dsRNA: a microinjeção no trato digestório, como por exemplo, em *Spodoptera exigua* para o gene de quitina sintase A (CHEN et al., 2008) e em *Phyllotreta striolata* para o gene do receptor olfativo (ZHAO et al., 2011), ou por meio de ensaios de alimentação, como por exemplo, em *Spodoptera exigua* para o gene de quitina sintase A (TIAN et al., 2009); em *Nilaparvata lugens* para o gene de trealose fosfato sintase (CHEN et al., 2010); em *Bactrocera dorsalis* para os genes ATPase vacuolar subunidade D, proteína ribossomal Rpl19, elongase Noa e GTPase Rab11(LI; ZHANG; ZHANG, 2011); em *Leptinotarsa decemlineata* para os genes de actina, proteína Sec23, ATPase vacuolar subunidades E e B e para proteína COP β (ZHU et al., 2010); em *Phyllotreta striolata* para o gene de Arginina kinase (ZHAO et al., 2008); e em *Bemisia tabaci* para os genes de actina, α -tubulina, ADP/ATP translocase, ATPase vacuolar subunidade A e proteína ribossomal L9 (UPADHYAY et al., 2011). Ainda Rosa et al. (2010) utilizaram RNAi para silenciar o gene de actina em cultura de células de *Homalodisaca vitripennis* via transfecção.

2.3 Tomateiro e *Tuta absoluta*

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*, Linnaeus, 1753) foi escolhido como planta modelo para este trabalho, pois além de ser uma das mais importantes solanáceas do mundo, é amplamente atacada pela traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta* Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), e dispõe de uma cultivar miniatura, denominada “Micro-Tom” que constitui numa excelente ferramenta para manipulação genética.

A cultura do tomateiro é de grande expressão econômica e social no mercado nacional e internacional, sendo a segunda hortaliça mais produzida no mundo, atrás somente da batata (FAO, 2013). De origem andina, seu cultivo está difundido por todas as regiões do mundo. O Brasil possui posição de destaque em termos de produção e produtividade, sendo o oitavo maior produtor mundial (FAO, 2013) com uma área de cerca de 69.300 ha cultivados e uma produção de cerca de 4.425.000 toneladas em 2011 (FNP), e o terceiro em produtividade, com cerca 64 t/ha. Na América do Sul, o Brasil é considerado o maior produtor de tomate “in natura” e para processamento industrial, suprimindo diversas agroindústrias.

O tomateiro pertence à família Solanaceae, importante família entre as plantas economicamente relevantes, e seus membros incluem culturas como a batata (*Solanum tuberosum*), berinjela (*S. melongena*), jiló (*S. gilo*) e a pimenta (*Capsicum*) e plantas medicinais como as do gêneros *Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus* e *Withania*, bem como plantas ornamentais como *Petunia* e *Nicotiana* (GUPTA et al., 2009). Embora as plantas dentro da família das solanáceas apresentem diversos hábitos e habitats, seus membros apresentam um alto grau de conservação de sequências gênicas, bem como de ordem gênica (TANKSLEY et al., 1992).

A cultivar ‘Micro-tom’ difere dos outros cultivares para apenas dois locos, o *dwarf* (*d*) uma mutação relacionada com o hormônio brassinoesteróide que confere o tamanho reduzido (BISHOP et al., 1999) e o alelo *self-pruning* (*sp*), que confere um crescimento determinado (PNUELI et al., 1998). Esta cultivar tem sido utilizado extensivamente em diversos estudos sobre desenvolvimento de frutos (SERRANI et al., 2007), interações hormonais (CAMPOS et al., 2009), resposta a estresses bióticos e abióticos (GRATÃO et al., 2008; HASE et al., 2008), colonização por micorrizas (ZSOGON et al., 2008) e para crescimento em microgravidade (ZRACHYA et al., 2007). Diversas ferramentas genéticas e fisiológicas estão disponíveis para este cultivar: protocolo de transformação (PINO et al., 2010), coleções de mutantes (CAMPOS et al., 2010), banco de ESTs, SNPs (www.kazusa.or.jp/jsol/microtom/index.html) e coleções de “anotações metabólicas” (IJIMA et al., 2008).

O tomateiro é uma das culturas mais sujeitas à ocorrência de pragas e doenças entre todas as espécies cultivadas (PICANÇO et al., 1998). De toda a produção de tomate, estima-se que cerca de 25% é perdida pela incidência de agentes etiológicos (GCC, 2002), sejam eles insetos, fungos, vírus ou bactérias. A perda somente pelo ataque de insetos-praga representa 10% deste total de danos ao cultivo do tomateiro (JANSSEN et al., 1999), sendo que os principais insetos causadores destes danos são da ordem Lepidóptera.

Atualmente, a traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta* Meyrick) representa um dos insetos-praga mais danoso a essa cultura, podendo alcançar a ordem de 80-100% de perda na produção (DESNEUX et al., 2010). As lagartas minam as nervuras das folhas, broqueiam as hastes e perfuram os brotos terminais, provocando a morte das gemas apicais (FILGUEIRA, 2003) (Figura 2). As lagartas ainda atacam os frutos verdes, principalmente no ponto de inserção do cálice, abrindo galerias no interior e provocando apodrecimento. Além do ataque direto, a traça do tomateiro abre portas para a infecção de patógenos secundários (FILGUEIRA, 2003).



Figura 2 – Prancha de fotos mostrando os danos causado pela traça-do-tomateiro as plantas de tomate bem como o potencial reprodutivo em uma gaiola de criação. Fotos: arquivo pessoal e galeria EPPO (“European Plant Protection Organization”)

Os primeiros relatos do ataque de *Tuta absoluta* foram descritos na década de 1980 na Argentina, Bolívia, Peru, Chile, Colômbia, Equador, Paraguai, Uruguai e Brasil (DESNEUX

et al., 2010). Em 2007, foi detectada a ocorrência de *T. absoluta* na Espanha, infestando rapidamente toda a costa do Mediterrâneo. Nos anos subsequentes, o dano causado pela *T. absoluta* foi reportado em plantações de tomateiro na Itália, sul da França, Grécia, Portugal, Marrocos e Tunísia (POTTING, 2009).

Parte desta ampla dispersão de *T. absoluta* é devido ao alto potencial reprodutivo. Com um ciclo de vida que dura cerca de 28 a 40 dias, uma fêmea adulta coloca cerca de 50 ovos por dia, possibilitando a geração de quase 300 ovos durante seu tempo de vida (SOUZA; REIS; SALGADO, 1992). Os ovos são colocados nas folhas, hastes, flores e frutos, sendo elípticos, de cor branca, e se tornam amarelados ou marrons (SOUZA; REIS; SALGADO, 1992). De três a cinco dias após a postura, as larvas eclodem e penetram imediatamente no parênquima foliar, nos frutos ou nos ápices das hastes, onde permanecem se alimentando por oito a dez dias, quando se transformam em pupas (SOUZA; REIS; SALGADO, 1992). As lagartas possuem de 1 mm (1º instar) a 7 mm (4º instar) de comprimento, inicialmente apresentam coloração amarelada passando para verde escura com uma placa marrom no dorso do primeiro segmento torácico. A fase de pupa dura de sete a dez dias, e as crisálidas são verdes escuras e ficam abrigadas nas folhas presas em finas teias, em casulos dentro do solo e/ou em lesões. Os adultos são pequenas mariposas cinza-prateadas com asas franjadas de 3 mm de comprimento e 10 mm de envergadura e podem viver até uma semana. Acasalam-se imediatamente após a emergência, voam e ovipositam predominantemente ao amanhecer e ao entardecer, ficando ocultados na face inferior das folhas durante o dia (SOUZA; REIS; SALGADO, 1992).

Devido à extrema importância da cultura do tomate no mundo, à intensidade dos ataques e à excepcional capacidade de dispersão da *T. absoluta* pela Europa, esta praga tem sido considerada como devastadora, e inúmeros esforços têm sido feitos visando seu controle de forma eficiente e sustentável (DESNEUX et al., 2010).

De modo geral, os atuais métodos de controle de *T. absoluta* possuem eficiência variada. O modo de controle mais utilizado no Brasil e nos países da América do Sul é o controle químico com a aplicação de inseticidas, entre eles os organofosforados, piretróides e o tiocarbamato (FRANÇA et al., 2000; LIETTI; BOTTO; ALZOGARAY, 2005). No entanto, o controle químico efetivo contra *T. absoluta* é difícil de obter devido ao comportamento minador das larvas, à falta de um limiar de ação, a deficiências nas tecnologias de *spray* (LIETTI; BOTTO; ALZOGARAY, 2005), e à ineficácia de alguns inseticidas contra esta praga (CASTELO BRANCO et al., 2001). Diversos estudos relataram que a aplicação constante de inseticidas promoveu sua perda de eficácia, além do desenvolvimento de

resistência da praga a esses inseticidas (SALAZAR; ARAYA, 1997; SIQUEIRA; GUEDES; PICANÇO, 2000; LIETTI; BOTTO; ALZOGARAY, 2005; SOUZA et al., 1992). A aplicação de inseticidas também causa a alteração do comportamento de inimigos naturais (DELPUECH et al., 1999; CASTELO BRANCO et al., 2003) e problemas ambientais. Resistência parcial a *T. absoluta* foi encontrada em espécies selvagens de *Solanum* (MALUF et al., 2010), em especial *S. habrochaites* e *S. pennelli* devido a presença de aleloquímicos, tais como do sesquiterpeno zengibereno e de acil-açúcares. Entretanto, a presença desses compostos restringem a infestação ainda em níveis que não impedem dano, e novas fontes de resistência são necessárias. Neste contexto, a adoção de novas tecnologias para o controle de *T. absoluta* se torna imprescindíveis.

Novas abordagens para o desenvolvimento de novas técnicas de controle de pragas baseiam-se na manipulação genética da praga, como por exemplo, a introdução de machos estéreis, ou da cultura-alvo por meio do melhoramento genético ou ainda pela introdução de cultivares transgênicos, expressando genes de resistência.

Como uma valiosa alternativa, podemos destacar o uso da técnica de RNAi em combinação com a transgenia como uma abordagem promissora no combate a pragas (GORDON; WATERHOUSE, 2007). O silenciamento por RNA para atingir pragas específicas soa como um perfeito modo para o manejo de pragas (ZHANG et al., 2012). Embora represente uma técnica promissora, dificilmente os métodos baseados em RNAi serão adotados como estratégia para o controle de pragas em um futuro próximo, pois muitos estudos básicos e aplicados ainda precisam ser conduzidos (ZHANG et al., 2012) e muitos avanços necessitam ser feitos para que este tipo de controle seja eficiente, sendo que experimentos de alimentação juntamente com técnicas de genômica podem ser importantes ferramentas para conseguir estes objetivos (HUVENNE; SMAGHE, 2010).

Sendo assim o presente trabalho teve como hipótese, que a técnica de RNAi pode ser usada para o controle de uma importante praga do tomateiro e de outras solanáceas, e que experimentos de alimentação, a caracterização molecular do inseto alvo e a transformação genética da planta hospedeira são ferramentas valiosas para provar o conceito de aplicabilidade desta técnica para esta praga.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criação de *Tuta absoluta*

A criação do laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP foi iniciada a partir de ovos obtidos do laboratório de Biologia de Insetos do departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, Piracicaba, SP. Para aumentar a variabilidade genética da população, pupas gentilmente cedidas pela empresa Bayer (São Paulo, SP, Brasil) foram misturadas a criação já estabelecida.

A criação foi mantida em laboratório sob temperatura de $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10 \%$ e fotofase de 14 h, segundo metodologia adaptada de Pratisoli (1995). Adultos foram mantidos em gaiolas de postura contendo plantas ou folhas de tomate. Folhas contendo lagartas tiveram seus pecíolos imersos em água em frascos plásticos a fim de manter sua turgescência. Tais frascos foram mantidos em bandejas plásticas de criação. Diariamente, substituíram-se as folhas, juntamente com os frascos, na medida em que estas se tornavam inadequadas à alimentação (desidratadas ou danificadas). As folhas danificadas contendo pupas foram mantidas em bandeja plástica por um ou dois dias, e depois foram colocadas em gaiolas teladas para emergência dos adultos.

3.2 Material vegetal

Foram utilizadas plantas de tomateiro das cultivares ‘Micro-tom’ para ensaio de transformação genética, e as cultivares ‘Santa Clara’ e ‘Cereja’ para manutenção da colônia de *Tuta absoluta* e nos ensaios de fornecimento de dsRNA.

3.3 Clonagem de genes candidatos

3.3.1 Escolha de genes candidatos e desenho de *primers*

Dois dos genes-alvo, V-ATPase subunidade A e Arginina Kinase, foram escolhidos baseado em casos de sucesso do uso da técnica de RNAi para o controle de pragas (BAUM et al., 2007; ZHAO et al., 2008). O gene codificador para um receptor de Ecdisona (EcR) foi escolhido baseado no seu papel fundamental durante o processo de ecdise em *Drosophila*. Larvas nocauteadas para EcR cessam o desenvolvimento durante os três primeiros estádios larvais (LI; BENDER, 2000). Sequências de aminoácidos dos genes-alvo (ATPase, Arginina Kinase e receptor de ecdisona- EcR) de diversas espécies de insetos, incluindo *Tribolium castaneum*, *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti*, *Bombyx mori*, *Manduca sexta* e

Leptinotarsa decemlineata, presentes no banco NCBI foram alinhados utilizando-se o programa CLUSTALW2 (LARKIN et al, 2007) para a identificação das regiões conservadas. As regiões conservadas foram analisadas visualmente quanto à degeneração de códons codificadores dos aminoácidos para o desenho de iniciadores. Enquanto que resíduos de Metionina e Triptofano apresentam apenas uma opção de códon, que significa uma degeneracidade igual a 1, os resíduos Leucina e Arginina possuem degeneracidade igual a seis combinações de nucleotídeos codificadores para cada um dos resíduos, o que resulta em uma degeneracidade igual a 6. As regiões com degeneracidade total menor que 1024 foram selecionadas para o desenho dos iniciadores (Tabela 1). Para avaliar a especificidade dos candidatos, foi efetuado em paralelo, o alinhamento das sequências de nucleotídeos correspondentes às sequências de aminoácidos alinhadas.

Tabela 1 – Descrição dos iniciadores degenerados utilizados nas clonagens dos respectivos genes candidatos em *T. absoluta* e tamanho dos fragmentos esperados em cada reação. Os números que precedem os *primers* significam a ordem em que foram usados nas reações de amplificação

Genes	Forward	Reverse	Tamanho Esperado
V- ATPase subunidade A	1. GTRGGNGTYATGGCNCANATHCA	1. TGNTCRAARTCNGCYTTDATYTT	1.635 pb
	2. ATGGCNACNATHCARGTNTAYGA	2. TTNACNGGRTCYTTRCCYTTTCAT	1.590 pb
		3. ACNTGYTTTRTARAANGGRCARAA	1.431 pb
Receptor Ecdisona (EcR)	1. TGYGTRGGNTGYAARGGNTTYTT	1. ACRTCCCADATYTCYKCNARRAA	1.023 pb
	2. TGYGTRATNGAYATGTAYATGMG	2. CARAARTGNARNARRTCYTCDAT	642 pb
		3. GTCATYACNGTDATYTGNCCKRAA	399 pb
Arginina Kinase	1. GGNTTYAARAARACNGAYAARCA	1. CCRTCRTDCATYTCYTTNACNGC	762 pb
	2. GARDVNCARTAYAARGARATGGA	2. CCNCCYTCNGCYTCNGTRTYTC	540 pb
		3. ARRTGRTCYTCYTCRTRCACCA	261 pb

R = purinas; Y = pirimidinas; M = A/C; K = G/T; H = A/C/T; B = C/G/T; V = A/C/G; N = todas bases.

3.3.2 Extração de RNA de *Tuta absoluta*

Para a clonagem dos genes candidatos, RNA total de *T. absoluta* dos primeiros estádios larvais foi extraído a partir de cerca de 100 mg de amostra utilizando o reagente TRIzol seguindo recomendações do fabricante (Invitrogen). Após o isolamento, o RNA total foi quantificado em espectrofotômetro e sua integridade foi examinada por eletroforese em gel de 1% agarose desnaturante contendo 6,6% de formaldeído em tampão MOPS. As amostras de RNA receberam tampão de carregamento (62,5% formamida; 1,14 M formaldeído, 1,25X tampão MOPS-EDTA-acetado de sódio; 200 µg mL⁻¹ de azul de bromofenol) e foram desnaturadas a 65° C por 5 min, resfriadas no gelo por 2 min e carregadas no gel, que após a corrida foi visualizado sob luz UV.

3.3.3 Tratamento com DNase I

Cerca de 1 µg de RNA total extraído foi tratado com DNase I (Fermentas) para eliminar contaminação com DNA genômico, para tal foram misturados, tampão de reação, 1

U de DNase I e 20 U de inibidor de RNase. A mistura foi incubada a 37 °C por 30 min, após este período foi adicionado 1 µL EDTA (50mM) e a solução aquecida a 65 °C por 10 min para inativação da enzima.

3.3.4 Síntese de cDNA

As amostras de cDNA foram sintetizadas utilizando-se o kit de transcrição reversa *SuperScript III* (Invitrogen). Para tal, foi acrescentado a 1 µg de RNA total tratado com DNase I, 500 µM de cada dNTP, 2,5 µM oligo dT em volume final de 13 µL, e a solução foi exposta a 65 °C por 5 min e resfriadas em gelo por 2 min. A seguir foram adicionados 4 µL de tampão 5X, 5 mM DTT, 2 U de inibidor de RNase e 200 U de transcriptase reversa *SuperScript III* em volume final de 20 µL. A reação foi submetida a 50 °C por 60 min, e a enzima foi depois inativada a 70 °C por 15 min.

3.3.5 Amplificação dos genes alvos e inserção em vetor de clonagem

Os genes alvos foram amplificados empregando a técnica de *Nested PCR*, na qual o produto da primeira reação é utilizado como molde na segunda reação utilizando-se pares de *primers* mais internos a região de anelamento dos *primers* da 1ª reação (Tabela 1). As reações de amplificação continham cerca de 100 ng de cDNA, 3 mM MgCl₂; 100 µM de cada dNTP, 2 U de *Taq DNA* polimerase *High Fidelity* em tampão adequado, e 1 µM de cada *primer* (Tabela 1), num volume de final de 20 µL. A segunda reação (*nested*) foi realizada sob as mesmas condições, exceto por empregar 1 µL do produto da primeira reação. A amplificação foi feita em termociclador *Veriti* (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA) empregando as seguintes condições térmicas: 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 40 s, 45 °C por 1 min e 72 °C de acordo com o tamanho do produto de amplificação (1 min/kb), finalizando a 72 °C por 10 min. Em seguida as amplificações foram analisadas por eletroforese em gel de 1% agarose. Os fragmentos de interesse foram então recortados do gel com auxílio de uma lâmina descartável e purificados utilizando-se o kit *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen) de acordo com especificações fornecidas pelo fabricante. A seguir, os fragmentos purificados foram clonados em vetor pGEM-T *Easy* (Promega), para sequenciamento e elaboração do RNA dupla fita. Para a clonagem dos fragmentos, cerca de 150 ng de DNA amplificado purificado foram alíquotados em microtubo juntamente com Tampão de Ligação, 50 ng de vetor pGEM-T *Easy* e 5 U de T4 DNA ligase e incubados à 4 °C por 16 h em reações de 10 µL. Em seguida, cerca de 3 µL da reação foi utilizado para a transformação de *Escherichia coli* cepa TOP10 via eletroporação.

A presença do inserto foi confirmada pela extração do DNA plasmidial por lise alcalina, seguida de análise de digestão com *EcoRI*. Cerca de 400 ng de plasmídeo contendo inserto foram digeridos em reações de 10 µL contendo tampão da enzima e 10 U de *EcoRI* por 1 h a 37° C, seguido de inativação da enzima a 65° C por 20 min. A presença do inserto também foi confirmada por amplificação do fragmento.

Para confirmação de identidade do gene de interesse, os plasmídeos foram sequenciados empregando o kit *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE)*. As reações de sequenciamento continham oligos T7 ou SP6, e foram conduzidas sob as seguintes condições de reação: 30 ciclos de 95° C por 20 s, 50° C por 15 s e 60° C por 60 s. Foram sequenciados três clones de cada transformação em aparelho ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

3.4 Ensaios de RNAi

3.4.1 Síntese de dsRNA a partir dos genes alvos clonados

A partir dos clones de cDNA dos fragmentos dos genes ATPase, Arginina Kinase e Receptor de Ecdisona (EcR) de *T. absoluta* inseridos no vetor pGEM-T (Promega), foi realizada a síntese do RNA de dupla fita (dsRNA) por reação de transcrição *in vitro* com a enzima T7 RNA polimerase (*MegaScript T7*, Ambion), segundo recomendações do fabricante. O vetor pGEM-T *Easy* contém o gene clonado flanqueado pelos sítio T7 e SP6, e as sequências alvo foram amplificadas utilizando-se *primer* T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG), juntamente com um *primer* em que a sequência do *primer* SP6 é seguida pela sequência do *primer* T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGGATTTAGGTGACACTATAG). Desta forma, obtêm-se as sequências dos genes de interesse flanqueadas por sítios de anelamento da polimerase T7. Esta reação de amplificação para adição dos sítios T7 às sequências alvo molde foi realizada em volume de 20 µL contendo 10 ng de DNA plasmidial, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 1 U de *Taq* polimerase e 0,5 µM de cada *primer*. As condições de reação foram 95° C por 2 min, 35 ciclos de 95° C por 15 s, 60° C por 20 s, 72° C por 30 s, terminando com ciclo a 72° C por 5 min. As reações foram então submetidas à eletroforese em gel de 1% agarose e os fragmentos de interesse extraídos do gel e purificados. Esta sequência molde foi então quantificada em fluorômetro e utilizada em reação de transcrição *in vitro* contendo cerca de 100 ng de DNA molde, tampão de enzima, 7,5 mM de cada ribonucleotídeo, 2 µL da RNA polimerase *MegaScript T7* (200 U) em volume de 20 µL. A reação foi incubada a 37° C por 16 h, sendo então adicionado 2 U de DNase e incubada a 37° C por mais 15 min para

degradação de DNA. A próxima etapa consistiu da purificação do RNA de fita dupla resultante, adicionando-se ao volume total de RNA extraído (20 µL), 30 µL de água-DEPC, e o RNA foi precipitado pela adição de 30 µL de solução 7,5 M cloreto de lítio e incubação a -20° C por 1 h. Após esse período, a solução foi centrifugada a 12.000 g por 15 min a 4° C, e o *pellet* de RNA foi lavado com 70% etanol e ressuspensão em água DEPC. Neste passo, cada sequência de gene clonada encontrava-se presumidamente na configuração de moléculas de RNA fita dupla.

Com o intuito de identificar potenciais efeitos adversos da introdução de RNA fita dupla no inseto, o dsRNA do gene GFP (*green fluorescent protein*) foi utilizado como controle negativo para os ensaios de alimentação. A sequência do gene GFP foi obtida por meio do vetor pCAMBIA1302, que contém o GFP como gene repórter, que foi amplificado utilizando-se os primers GFP-F (5' TAATACGACTCACTATAGGGCAGTGGAGAGGGTGAA) e GFP-R (5' TAATACGACTCACTATAGGGTTGACGAGGGTGTCTC), que contém segmentos gene-específicos seguidos pela sequência de primers T7 *forward* e *reverse* (nucleotídeos sublinhados). Dessa forma, o produto de amplificação foi flanqueado pela sequência do promotor T7, empregada para realizar transcrição *in vitro*. As reações de amplificação do molde (276 pb) e de transcrição *in vitro* foram realizadas nas mesmas condições descritas para os genes alvos, obtendo fragmento.

3.4.2 Ensaios de fornecimento de RNAi a *Tuta absoluta*

O efeito do silenciamento gênico foi testado por meio de ensaios de alimentação das lagartas com folhas de tomateiro contendo moléculas de RNAi dos genes-alvo citados anteriormente. Dois tipos de ensaios foram testados para a avaliação do silenciamento dos genes alvos nas lagartas de *Tuta*, e a avaliação dos efeitos foi conduzida por análise da expressão gênica por RT-qPCR, por mortalidade, ou por avaliação de dano das folhas de tomateiro.

No primeiro tipo de ensaio para avaliação da expressão gênica dos genes alvos nas lagartas, folhas de 'Micro-Tom' foram destacadas da planta e o pecíolo foi imerso em 200 µL de solução aquosa contendo cerca de 5 µg dos respectivos dsRNA dos genes alvos independentemente em microtubos. Após a absorção da solução, lagartas recém-eclodidas de *T. absoluta* foram colocadas para se alimentar nestas folhas, sendo coletadas aos 24, 48 e 72 h após o início da imposição dos tratamentos. Como controle negativo do experimento, outro grupo de lagartas foi alimentado com folhas que absorveram dsRNA para o gene GFP. Para

cada tratamento foram realizados dois experimentos independentes com uma duplicata biológica.

No segundo tipo de ensaio, folíolos de tomateiro ‘Santa Clara’ foram infiltrados com solução contendo suspensão de células de *Agrobacterium tumefaciens* transformada com os vetores de silenciamento dos genes alvos ATPase ou Arginina Kinase (descritos no item 3.5.1), assim como vetor de silenciamento para o gene GFP (gentilmente cedido pelo Prof. Eric Lam, *Rutgers University*) como controle, para um ensaio transiente. Para tal, células de *Agrobacterium* contendo os três tipos de construções foram inoculadas individualmente em cerca de 3 mL de meio LB líquido contendo gentamicina (25 µg/mL) e spectinomicina (100 µg/mL), e foram cultivadas por cerca de 12 h. A seguir, cada cultura foi coletada em tubos Falcon e centrifugada a 4.000 rpm por 5 min, e o pellet de bactérias foi ressuspensão em água milli-Q para uma absorbância (600nm) de aproximadamente 0,5. As suspensões foram então infiltradas na face abaxial das folhas de tomateiro destacadas com o auxílio de microseringa, e as áreas infiltradas foram delimitadas com caneta marca-texto. Após 24 h de infiltração, lagartas recém-eclodidas foram colocadas para se alimentar nas áreas foliares infiltradas, sendo coletadas 24 h, 48 h e 72 h para análise de expressão dos genes alvos correspondentes por RT-qPCR. Como controle positivo deste experimento, foi empregada a infiltração com agrobactéria contendo o gene repórter GFP, de forma a tornar possível a visualização da expressão transiente do gene inserido. Nestes ensaios foram utilizados duas cepas de *Agrobacterium* GV3101/pMP90 (cedidas pelo Prof. Eric Lam), sendo uma delas contendo vetor que direciona a superexpressão da proteína GFP para o nucléolo das células transformadas, chamadas de *enhanced GFP* (eGFP), e outra que possui vetor para o silenciamento do gene GFP (GFPi). Num primeiro ensaio, as bactérias eGFP foram infiltradas em folhas de tomateiro. Num segundo ensaio, ambas as cepas de bactérias (eGFP e GFPi) foram misturadas e infiltradas, sendo visualizadas em microscópio de fluorescência após dois dias de modo a verificar a expressão de GFP nos nucléolos das células. Os efeitos do silenciamento gênico tanto para os ensaios de infiltração de dsRNA como para os ensaios de transformação transiente por agrobactéria foram analisados por meio da quantificação da expressão dos genes-alvo por RT-qPCR (ver abaixo) nas lagartas expostas aos tratamentos e seus respectivos controles.

Os efeitos do silenciamento dos genes candidatos também foram avaliados por meio de ensaio de mortalidade, onde folhas de tomateiro ‘Santa Clara’ foram destacadas e o pecíolo imerso em 200 µL de solução contendo cerca de 20 µg de dsRNA dos genes alvos ou do gene-controle GFP. A seguir, 20 lagartas de *T. absoluta* recém-eclodidas foram colocadas

para se alimentar nestas folhas, e após 11 dias, foram coletadas para análise de sobrevivência. Outro ensaio foi conduzido empregando folíolos de tomateiro ‘Santa Clara’ destacados, com o peciólulo imerso em solução contendo doses crescentes de dsRNA (500, 1000 ou 5000 ng) dos genes-alvo ou do gene controle GFP. Neste último ensaio, cinco lagartas recém-eclodidas foram colocadas para se alimentar em cada folíolo, que foram fotografados durante 11 dias para avaliação dos danos causados à folha.

3.4.3 Extração de RNA e síntese de cDNA de *T. absoluta* para análise de expressão gênica

RNA total de larvas de *T. absoluta* foi extraído a partir de cerca de 100 mg de amostra utilizando o reagente TRIzol, seguindo recomendações do fabricante (Invitrogen). Após o isolamento, o RNA total extraído foi quantificado em espectrofotômetro. Para síntese de cDNA, cerca de 1 µg do RNA total foi tratado com 1 U de DNase I para eliminar contaminação com DNA genômico. A seguir, o cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit de transcrição reversa *high capacity cDNA reverse transcriptase* (Applied Biosystems). Para tal, foi acrescentado para cada 1 µg de RNA total tratado com DNase I, 2 µL de tampão 10X, 4 mM de cada dNTP, 1X *primers* aleatórios (fornecidos no kit), e 50 U de transcriptase reversa *MultiScribe* (Life Technologies) em volume final de 20 µL. A reação foi submetida a 25° C por 10 min, seguida de 37° C por 120 min, e a enzima foi depois inativada a 85° C por 5 min.

3.4.4 Análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

As reações de amplificação continham cerca de 40 ng de cDNA de lagartas, 5 µL de *Fast SYBR Green Master* (Invitrogen), 0,2 µM de cada iniciador (Tabela 2) num volume final de reação de 10 µL. O perfil da reação foi designado com duas temperaturas iniciais: 50° C por 10 min e 95° C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de três passos: 95° C por 15 s, 60/61° C por 25 s e 72° C por 30 s realizadas no RotorGene-6000 (Qiagen). Após a amplificação, determinou-se a curva de dissociação (*melting curve*) entre 72° C e 95° C. As análises de RT-qPCR dos genes alvo para o silenciamento nos experimentos foram realizadas em triplicata técnica, com controle negativo (sem cDNA) em duplicata. Todos os primers foram testados para eficiência de reação (E) através da curva padrão obtida com os valores de expressão (C_q) de 4 diluições seriadas (10, 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). (PFAFLL, 2001) (AnexoA). Em todos os experimentos, os valores dos C_q (*cycle quantification*) foram utilizados para determinar a diferença da expressão gênica, de acordo com método ‘Delta Delta’ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001): razão = $E^{-\Delta(\Delta C_q)}$ sendo $\Delta C_q = C_q$ (gene alvo) - C_q (gene referência) e o $\Delta =$

ΔC_Q (tratamento) - ΔC_Q (controle). Foram utilizadas como controle negativo, o gene alvo nas lagartas que receberam o dsRNA do gene GFP. Como gene de referência (normalizadores endógenos) foram selecionados os genes *Rpl 5* (proteína ribossomal subunidade grande 5), *Rpl23A* (proteína ribossomal subunidade grande 23A) e *rRNA* (RNA ribossomal) (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição dos iniciadores gene específicos para análise transcricional dos genes alvos de silenciamento e normalizadores endógenos. Estão listadas as respectivas siglas, as sequências dos iniciadores e o tamanho do amplicon em pares de pares (pb)

Genes	Sequência (5'- 3')	Amplicon (pb)
<i>ATPase</i>	F: ACCTGTCTGGAGATCGTGACAG	139
	R: AACGGGCAGAAACGGTCGTA	
<i>AK</i>	F: GGCACATTCTACCCACTCAC	190
	R: GATGGTCCTCTTCGTTGCAC	
<i>EcR</i>	F: GCCAGATCAAGAGGAACGAG	166
	R: GCTTCTCGGGCAGGAACC	
<i>Rpl 5</i>	F: CAGTCGTCGAGCCAGCAACA	129
	R: TCCCGCATTGAAGGAGACCA	
<i>Rpl 23A</i>	F: TTGACGCCATAACGTGGCAGT	170
	R: CGCAAACGCCTGACTGTTCA	
<i>rRNA</i>	F: TATGTTGTGAGGCGACGATG	155
	R: GATCCACCGTCCAGGGTAAT	

3.5 Transformação genética do tomateiro ‘Micro-Tom’

3.5.1 Construção dos vetores para silenciamento em plantas

Para a transformação genética de plantas de tomateiro cultivar “Micro-Tom” foram realizadas construções empregando o vetor de silenciamento pK7GWIWG2(I), compatível com o sistema GATEWAY (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002). Primeiramente, foram desenhados *primers* para amplificação dos fragmentos dos três genes alvos (Tabela 3) de modo que os fragmentos fossem flanqueados pelas sequências de recombinação *attL1* e *attL2* (sublinhadas nos *primers*), compatíveis com as sequências *attR1* e *attR2* do vetor. Tais *primers* foram utilizados em reações de amplificação contendo cerca de 10 ng de DNA, 200 μ M de cada dNTPs, 0,4 μ M de cada *primer*, 2 U de *Phusion* DNA polimerase *high fidelity*

(New England Biolabs; Ipswich-MA, EUA) em volume final de 50 μL . As condições de amplificação, específicas para a polimerase empregada foram 98° C por 2 min, seguidos de 35 ciclos de 98° C por 10 s, 60° C por 15 s e 72° C por 15 s, mais um ciclo de 72° C por 5 min. Os produtos das reações foram separados por gel eletroforese, e os fragmentos foram purificados empregando o kit *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen), e foram quantificados em Nanodrop (Thermo Scientific; Pittsburgh-PA, EUA). Cada fragmento foi submetido a reação de recombinação utilizando-se a enzima *LR clonase* (Invitrogen), utilizando 150 ng do fragmento, 150 ng de vetor pK7GWIWG2(I), 2 μL do mix da enzima e tampão TE para volume final de 10 μL . A reação ocorreu a 25° C por cerca de 16 h, quando foi adicionado 1 μL de proteinase K (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e os tubos foram colocados a 37° C por 10 min para parada da reação. A transformação de *Escherichia coli* cepa TOP10 foi realizada com 3 μL de cada reação via choque térmico. Após um curto período de proliferação, as bactérias foram plaqueadas com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de espectinomicina e crescidas por cerca de 16 h. Foram selecionadas 10 colônias para extração do DNA plasmidial por lise alcalina.

Tabela 3 – Descrição dos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos dos genes-alvo com bordas L1 e L2 (sublinhadas nos *primers* F e R). Estão listados a sigla dos genes, as sequência dos iniciadores e o tamanho do amplicon esperado em pares de base (pb)

Genes	Sequências (5'- 3')	Amplicon (pb)
ATPase	F: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGTATTGCGTACCGGCAAG R: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACCTGTTTGTATAACGGGCAG	514
EcR	F: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATACACTATCTATACATATAC R: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACAGTAGTGCCATTAACCGAC	545
Arginina Kinase	F: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGAGGCTCAATATAAGGAAATG R: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAAGATGGTCCTCTTCGTTGC	320

Para confirmação das inserções dos fragmentos gênicos de interesse no vetor de destino de maneira correta, foram realizadas análises de digestão *in silico* comparativas do vetor antes e depois da inserção, com auxílio do software *NEBcutter* (VINCZE; POSFAI; ROBERTS, 2003). Para tal foram selecionadas enzimas de restrição cujo produto da digestão fornecesse evidências sólidas da correta posição dos fragmentos nos vetores. As digestões foram realizadas com cerca de 400 ng de plasmídeo em reações de 10 µL contendo tampão da enzima e 10 U de enzima específica por 1 h a 37°C, seguido de inativação da enzima a 65°C por 20 min. Os produtos de digestão foram analisados em gel de 0,8 % agarose. A presença do inserto também foi confirmada por amplificação do fragmento utilizando *primer* gene específico.

Os vetores binários de transformação de plantas foram inseridos em *A. tumefaciens*, cepa GV3101/MP90, via choque térmico conforme descrito anteriormente. A confirmação destas bactérias para a presença do vetor foi realizada por PCR.

3.5.2 Transformação genética

A partir das construções contendo o cassete para expressão dos dsRNAs para silenciamento dos genes ATPase e Arginina Kinase no vetor pK7GWIWG2(I) (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002), foram conduzidos ensaios de transformação genética com explantes cotiledonares de plântulas de ‘Micro-tom’ com 8 dias de idade (Figura 3; PINO et al., 2010). Para tal, sementes de ‘Micro-Tom’ foram esterilizadas por agitação em 100 mL de 30% (v/v) de água sanitária comercial (2,7% de hipoclorito de sódio) com duas gotas de detergente comercial por 15 min. Em seguida, as sementes foram lavadas por 3 vezes com água estéril, e cerca de 30 foram colocadas em frascos contendo 30 mL de meio de cultura

MS meia força para germinação (Figura 3), mantidos no escuro por 4 dias, quando foram transferidos para sala de luz onde permaneceram por mais 4 dias. Os explantes cotiledonares foram então excisados, com suas extremidades removidas e seccionados transversalmente. Esses segmentos foram então cultivados em meio MS contendo $0,4 \mu\text{M}$ de ácido naftaleno acético (ANA). Cerca de 20 explantes foram colocados por placa de Petri e empregados na transformação (Figura 3).



Figura 3 - Ilustrações do processo de transformação de plantas, iniciando com germinação in vitro das sementes de tomateiro, seguido de plântula com 8 dias de idade e obtenção de explantes cotiledonares

As cepas de *Agrobacterium* (GV3101/MP90) foram cultivadas em meio LB sólido contendo 50 mg L^{-1} de rifampicina, 25 mg L^{-1} de gentamicina e 100 mg L^{-1} de espectinomicina por 48 h a 28° C . Em seguida, uma colônia foi isolada e transferida para 3 mL de meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos usados anteriormente, cultivados a 28° C por 48 h a 120 rpm. Após esse período, 500 μL dessas culturas foram inoculadas em 50 mL de meio LB líquido com os mesmos antibióticos, e incubada a 28° C por 12 h a 120 rpm. As culturas foram então centrifugadas por 15 min a 4.000 rpm e o sedimento ressuspense em meio MS líquido até $\text{OD}_{600\text{nm}}$ entre 0,2 e 0,3. A seguir, foi acrescido acetoseringona a uma concentração final de $100 \mu\text{M}$, e após 10 min, a suspensão de *Agrobacterium* foi utilizada. Duas gotas dessa suspensão foram aplicadas em cada explante, seguido de inoculação por 10 min e remoção e secagem do excesso de bactéria com folhas de papel de filtro estéril. O co-cultivo foi conduzido por 48 h no escuro a 28° C . Após esse período, os explantes foram transferidos para placas contendo o Meio Indutor de Gemas (SIM), composto por sais MS e $5 \mu\text{M}$ de benzilamino purina (BAP) (PINO et al., 2010), suplementado com 100 mg L^{-1} de kanamicina e 300 mg L^{-1} de timentina, e cultivados durante 3 semanas sob fotoperíodo de 16 h a 25° C . Após esse período, gemas bem desenvolvidas foram separadas dos explantes e

transferidas para frascos contendo 30 mL de meio MS contendo 100 mg L⁻¹ de kanamicina e 300 mg L⁻¹ de timentina, onde permaneceram por volta de 2 semanas para desenvolvimento de raízes.

Plântulas T₀ com raízes bem desenvolvidas foram transferidas para a casa de vegetação para aclimatização em vasos de 250 ml contendo substrato específico e vermiculita (1/1 vol.), sendo protegidas por sacos plásticos por cerca de 10 dias.

3.5.3 Análise das plantas regenerantes

3.5.3.1 Extração de RNA e DNA

O RNA total e o DNA genômico das plantas transgênicas foram extraídos a partir de cerca de 100 mg de tecido foliar com o reagente Trizol (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. A quantidade e a qualidade do RNA total extraído foi realizada como descrita anteriormente no item 3.3.2. O DNA genômico foi quantificado em fluorômetro.

3.5.3.2 Confirmação da transformação por PCR

Para confirmação da inserção do transgene foram realizadas reações de amplificação utilizando-se oligos antisense específicos dos genes inseridos (ATPse ou AK) (Tabela 2) e um oligo senso que se anela no promotor 35S (5' GCACAATCCCCTATCCTTC 3'). As reações foram conduzidas nas seguintes condições: cerca de 100 ng de DNA genômico, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 μM de dNTPs, 0,1 μM de cada *primer*, 1,5 U de enzima *Taq* DNA polimerase em tampão de reação, em volume de 25μL. As condições de amplificação foram 95° C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95° C por 15 s, 60° C por 25 s e 72° C por 40 s e extensão final de 72° C por 5 min. Os produtos de amplificação foram então submetidos a eletroforese em gel de 1% agarose.

3.5.3.3 RT-PCR gene específica

Para confirmação da presença do transcrito, que irá gerar os respectivos dsRNAs nas plantas transgênicas, produto da expressão do transgene, foram realizadas reações de transcrição reversa utilizando-se *primers* gene específicos (ATPase ou AK; Tabela 2). Também foi adicionado na mesma reação *primers* do gene da ubiquitina como controle endógeno. Para tal, cerca de 1 μg de RNA tratado com DNaseI (como descrito no item 3.3.3), foi misturado a *primers* gene específico (ATPase ou AK) a 0,75 μM, *primer* gene controle endógeno também a 0,75 μM, 0,5 mM de cada dNTP, tampão de reação, 200 U de

Transcriptase reversa *Revertaid* (Fermentas) e água DEPC para o volume de 20 µL. A reação foi incubada a 50° C por 30 min e a 85° C por 5 min para inativação da enzima.

A seguir 1 µL dos cDNAs gerados foram submetidos a reações de amplificação nas seguintes condições: 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,1 µM de cada *primer*, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase e água para o volume de 25 µL. As condições de amplificação empregadas foram: 95° C por 2 min, seguidos de 35 ciclos de 95° C por 15 s, 60° C por 30 s e 72° C por 20 s. Os produtos de amplificação foram então analisados por eletroforese em gel de 1,5% agarose.

3.5.3.4 *Stem loop pulsed* RT-PCR

Para identificação dos siRNAs nas plantas transgênicas foi realizado uma técnica de RT-PCR baseada no protocolo descrito por Varkonyi-Gasic et al. (2007) desenvolvido especificamente para amplificação de pequenos RNAs chamado “*Stem loop pulsed*” RT-PCR. Primeiramente, as sequências gênicas inseridas nas plantas transformadas foram submetidas a análise em um *software* de predição de siRNAs (RICE; LONGDEN; BLEASBY, 2000) para se obter uma lista dos possíveis siRNAs gerados pela maquinaria celular de silenciamento. A seguir, foram sintetizados *primers* “*stem loop*” específicos para cada siRNA preditos, *primers* específicos para PCR e o *primer* universal (VARKONYI-GASIC et al, 2007) (Tabela 4). Como controle endógeno foram desenhados *primers* para amplificação de microRNA 156 (MIR156) de tomateiro através das sequências disponíveis na base de dados *miRBase* (KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2011).

Tabela 4 – Sequências dos pequenos RNAs específico para cada gene, e dos *primers* utilizados para detecção de expressão em plantas transgênicas

Gene		Sequência (5' - 3')
ATPase	siRNA	AATACATGCGCGCTCTAGATGAC
	RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGTCATC
	PCR primer F	CCGGAGAATACATGCGCGCTC
AK	siRNA	AAGTATCGTCCACACTGTCTGGC
	RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCCAGA
	PCR primer F	CGGCGGAAGTATCGTCCACAC
MIR156	miRNA	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC
	RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGCTCT
	PCR primer F	CCTGAGTGACAGAAGAGAGTG
	Universal R	GTGCAGGGTCCGAGGT

A reação de transcrição reversa foi realizada adicionando os *primers* “*stem loop*” a 0,05 µM e oligodT a 0,5 µM e 1 µg do RNA tratado. Essa solução foi aquecida a 70 °C por 10 min e resfriada a 4° C por mais 10 min. A seguir, foi adicionado solução contendo tampão de reação, 3 mM de MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 200 U de transcriptase reversa *Revertaid* (Fermentas) e água DEPC para volume de 20 µL. A reação foi submetida a um ciclo pulsado para síntese de cDNA: 16°C por 30 min, seguido de 60 ciclos de 30° C por 30 s, 42° C por 30 s e 50°C por 1 s, mais um período a 85° C por 5 min para inativação da enzima.

Os cDNAs sintetizados foram utilizados em reações de amplificação nas seguintes condições: 1 µL de cDNA, 1,5 mM MgCl₂ a, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer*, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas) em tampão apropriado e água para o volume de 25 µL. As condições de ciclagem foram: 94° C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94° C por 15 s e 60° C por 1 min. Os produtos de reação foram analisados em gel de 3% agarose.

3.5.3.5 Experimentos de herbivoria

Para os experimentos de herbivoria folhas de tomateiro transgênicos dos eventos de transformação, ATPase 1.1, ATPase 7, ATPase 9 e AK 1.1, mais o tipo selvagem, foram retiradas das plantas (T₀) e colocadas em recipiente com água. A seguir 10 lagartas recém eclodidas de *T. absoluta* foram colocadas para se alimentar nestas folhas, que foram fotografadas durante 7 dias para visualização dos danos. Na medida que as folhas foram

completamente degradadas, estas foram substituídas e ao fim do ciclo das lagartas as pupas foram coletadas para contagem, pesagem e análise visual.

3.6 Caracterização do transcrito de *T. absoluta* por RNA-seq

3.6.1 Extração de RNA de *T. absoluta* para o sequenciamento massivo

O RNA total de *T. absoluta* para o sequenciamento massal foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen). Cerca de 10 µg de RNA total de cada fase de desenvolvimento: ovos, 1º, 2º, 3º, 4º instar larval e adulto (Figura 4), foram enviados para empresa Macrogen, Seul, Coréia do Sul, para sequenciamento em equipamento HiSeq 2000 (Illumina). Primeiramente, foram conduzidas análises das amostras de RNA total para qualidade e integridade por Bioanalyzer (Agilent Technologies). Após aprovadas nestes testes, foram construídas 6 bibliotecas, uma para cada amostra de RNA total utilizando-se o kit *TruSeq RNA Sample Prep* (Illumina), e estas foram sequenciadas a partir de cada extremidade (*paired-end read*).

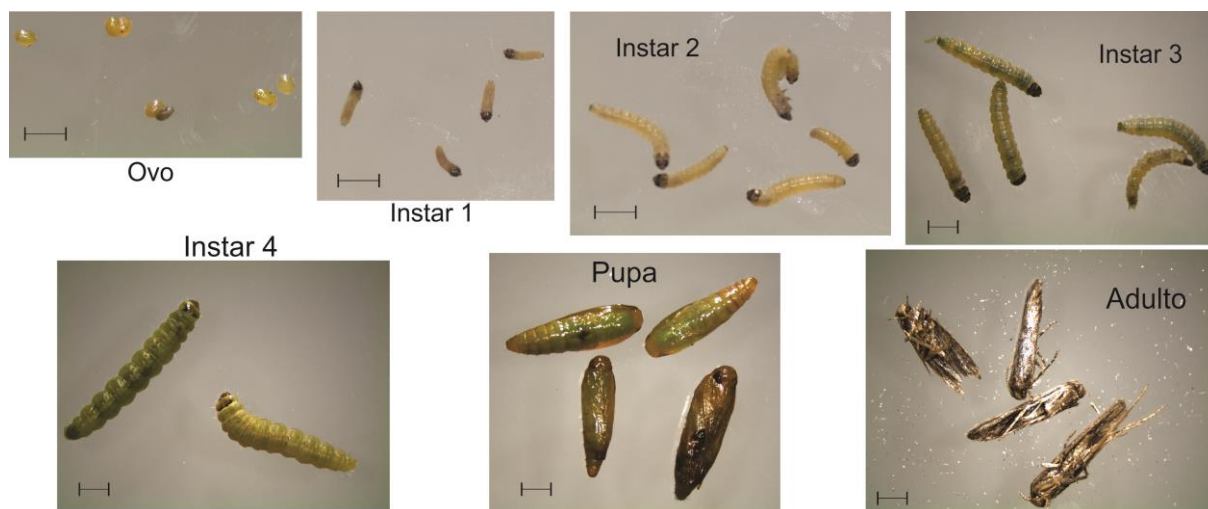


Figura 4 – Prancha de fotos das diferentes fases de desenvolvimento de *T. Absoluta*, a escala das fotos mostra a medida de 1mm

3.6.2 Análises de bioinformática do RNA-seq

3.6.2.1 Montagem de transcrito de referência a partir dos dados de sequenciamento RNaseq

Devido à indisponibilidade de genoma de referência para analisar os dados de RNA-seq de *T. absoluta*, foi utilizada estratégia de montagem *de novo* do transcrito. Primeiramente os dados gerados pelo sequenciamento foram analisados utilizando-se o

software CLC Genomics Workbench (CLC Bio; Aarhus, Dinamarca). Os arquivos FASTQ oriundos do sequenciamento, foram limpos (*trimmed*) para extração das sequências dos adaptadores e para exclusão de sequências com baixa qualidade. A seguir, os seis arquivos, referente a cada biblioteca/fase de desenvolvimento, foram submetidos a alinhamento (*de novo assembly*) para geração do transcrito do inseto. Cada arquivo foi comparado com alinhamento gerado para estimação da expressão gênica.

Numa segunda abordagem conduzida pelo Dr. Roberto Herai, Embrapa Informática, foi realizado um novo *de novo assembly*. As bibliotecas sequenciadas foram analisadas empregando o NGS QC Toolkit (PATEL; JAIN, 2012) para verificar a qualidade dos *reads*, bem como a presença de artefatos oriundos do sequenciamento ou da preparação das amostras, como adaptadores e sequências de baixa qualidade. A partir disso, foi aplicada uma ferramenta disponível em Grabherr et al. (2011), na qual se reduz a cobertura do sequenciamento das regiões com alta densidade de fragmentos para 30X. Isso permite otimizar o desempenho computacional da montagem do transcrito. Tais dados foram então analisados com a ferramenta de montagem de transcrito *de novo* Trinity (GRABHERR et al., 2011). A ferramenta foi configurada para permitir a montagem de fragmentos maiores com sobreposição variando entre 35 e 55 pb, para que ao final sejam relatados apenas os contigs com pelo menos 300 pb. O transcrito gerado foi utilizado como referência na análise de expressão gênica de *T. absoluta*. Após montagem do transcrito e obtenção da lista de contigs, foi conduzida a anotação dos contigs por análise de ontologia gênica (GO) empregando-se o programa Blast2Go (CONESA et al., 2005).

3.6.2.2 Análise de expressão gênica diferencial

Os dados de sequenciamento das bibliotecas foram então alinhados contra o transcrito de referência criado. Para esta etapa, o filtro que reduz a cobertura do sequenciamento não foi utilizado, pois a densidade interfere na variação de expressão gênica dos transcritos. O alinhamento das bibliotecas foi realizado com a ferramenta Bowtie2 (LANGMEAD et al., 2009). Após a etapa de alinhamento das bibliotecas de *reads* filtrados, foram obtidos os valores de *read counts*, que representam o número de *reads* que foram mapeados em cada um dos genes. Essa metodologia se baseia na distribuição binomial negativa, aplicada para calcular a variação da expressão de um transcrito entre distintas amostras, e também a significância estatística da variação de expressão. Para controlar a ocorrência de eventos com variação de expressão que sejam possivelmente falsos positivos, foi aplicado o teste estatístico FDR (*False Discovery Rate*; BENJAMINI; HOCHBERG,

1995) sobre a significância estatística correspondente à variação de expressão gênica entre as amostras. Tais análises foram realizadas no pacote DESeq (<http://www.bioconductor.org/packages/2.6/bioc/html/DESeq.html>) do ambiente estatístico R. Foram comparados os valores de expressão entre fases distintas, nos quais foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles com variação de expressão superior a dois (*fold-change*) entre amostras, com significância estatística (*p value*) menor que 0,05%. A partir desta análise foi possível obter lista dos genes que são diferencialmente expressos e constitutivos em cada evento de alteração da fase de desenvolvimento de *Tuta absoluta*. Para obter uma descrição funcional de cada transcrito diferencialmente expresso entre as amostras avaliadas foi feito o uso da ferramenta Blast2GO (CONESA et al., 2005).

A relação quantitativa dos genes diferencialmente expressos entre as distintas fases foi representada em diagramas de Venn (OLIVEROS, 2007). Nesses diagramas, os genes diferencialmente expressos de todas as fases de desenvolvimento foram comparados entre si para assim identificar aqueles que são comuns ou exclusivos de cada fase.

3.6.2.3 Agrupamento (*clustering*) das amostras

As bibliotecas de sequenciamento filtradas e alinhadas contra o transcrito de referência criado foram agrupadas (*clustered*) para que fossem obtidos dendrograma e *HeatMap*. Para tal, os valores de expressão gênica já normalizados para cada transcrito de uma determinada amostra foram comparados com todas as outras amostras, gerando assim uma matriz de distâncias Euclidianas, com cada par de linha e coluna correspondendo a uma determinada distância entre duas amostras distintas. Para a criação do dendrograma, a matriz de distâncias foi analisada, e as amostras com perfil de expressão mais similares entre si foram agrupadas de acordo com o *single linkage method*. Além do dendrograma, foi criado também um gráfico do tipo *HeatMap*, que transforma em cores os valores normalizados da matriz de distâncias. As cores podem variar de branco (maior diferença entre as amostras) para vermelho (amostras idênticas).

3.6.3 Validação da expressão diferencial entre fases de desenvolvimento (bibliotecas)

Foram selecionados 23 genes diferencialmente expressos para condução da validação biológica dos dados observados pelas análises de bioinformática (2ª montagem descrita acima). A validação foi conduzida por análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR). Iniciadores específicos para 22 contigs foram desenhados (Tabela 5). As amostras analisadas derivaram de RNA total obtido de três amostras biológicas de cada

fase de desenvolvimento (ovo; 1^o, 2^o, 3^o, 4^o instar; e adulto) (Figura 4) e os respectivos cDNAs foram sintetizados conforme descrito no item 3.3.3.

Tabela 5 - ID dos contigs, sequência dos oligo iniciadores (*primers*) e tamanho do produto de amplificação dos gene escolhidos para validação do RNA-seq

Contig	Foward	Reverse	Amplicon
2406	GACCAAGGACGGCAAGTTCA	GTAGTTCAGGCGGTTTGCT	139
6681	TTCTGCCTATGCGGGAGGAG	GACGACGAGTGCCGATCTTG	119
10806	GAATCCAACCTGCGGAAAG	TTGTCACCTCCGTTGTTT	161
11301	TGAGAGTGAGAGCGACAGTA	GCCACAAACGGAGAACTTTC	189
12524	CGTACTCGTATCTCATCATATCAC	CGTTCACTAGTTGCGACTC	114
12828	TCTCCATCATCTTGAAGTGT	AGAAGGAATGCCAGGAAT	174
13135	GCATAGGTCTGCATCGCTGATAA	CGAACGTGCTCGGTCCAA	119
16411	GCTGTGGGAGCATGTGGTT	GTCAACCTGGCTTTCTCTTTGG	171
16428	GTTGAAGACGGTGTGGGGG	GAAGGCACCGAATGGCAAGA	147
17745	TCGGAGCGCATCTTGAAAC	CACCAAAGATAGGGCCAGCG	180
20172	TGGCAAGGGAATGAATGGAG	TTGGCTCTGGCTGTTTGTT	133
21584	GCACGCATTTGTTGCTCTG	GAGATGCGAGTCCCTTTGCC	137
23824	ACGGTGCTGGCAAGGTGT	CCACTGCTTGAGGGTCTTCC	185
26572	GCCATAATTCAAAGTGGACCGAT	GGTCGCTGTTTCTACAACCTTGAA	174
36206	CCATTCAAGTTGCAGAGA	GGTAGGGAGAATTGTTGTT	105
36279	TCCTCACTGTCCCGTCCAAG	GAAGAGAACCAACCACCAGCA	101
38086	ACAACCGGCACAACAATCCA	CCCGTTTTCCCAAGGGGATG	189
50455	CGCACAGACATTCGGAGCTT	AATGGCAGCGAAGGTTCTGG	111
55173	GGTCGTCGTAACAATACCAGCA	GCGAACAAGGGCACCATC	141
58512	GGGCATGTGGAACGAGTACG	GAGGAGCAGACCTGGGTGAA	141
75835	TTGTCGGATTCAAGACGATTCTC	CGTGCGTTTGTCTGGAAGT	128
77615	CAGAACGCTGAAGGAGTC	CACCTTCTACAACGCCAAC	100
81147	CCTACTCCGCTTACCGTCAA	ACTCTCAAGAAGAAGACTCCACTT	165

As reações de amplificação quantitativa de transcritos reversos foi realizada como descrito no item 3.4.4 e as análises dos dados gerados foram realizadas com auxílio do

software REST (*Relative Expression Software Tool*; PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). As análises de eficiência de reação (E) foram realizadas como descrito no item 3.4.4 e são mostradas no Anexo B.

3.7 Novos genes alvos de silenciamento a partir do transcrito gerado

3.7.1 Escolha dos novos alvos

A partir das análises dos dados gerados pelo RNA-seq, chegou-se a uma lista de contigs altamente expressos nos primeiros estádios larvais de *T. absoluta* a partir da primeira montagem. Desta lista, foram escolhidos 11 contigs que apresentaram similaridade com proteínas já descritas na literatura e possivelmente representam alvos com potencial de controle via silenciamento. Foram desenhados *primers* para amplificação destes contigs/genes (tabela 6) contendo as bordas de recombinação para o vetor de transformação (*attR1* e *attR2*) de plantas.

Tabela 6 – Descrição dos iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação dos fragmentos dos genes-alvo com bordas *attL1* e *attL2* (sublinhadas nos *primers* F e R). Estão listados os Ids dos contigs, as sequências dos primers e o tamanho do amplicon em pares de bases (pb)

ID Contig	Sequência (5' - 3')	Amplicon (pb)
77	F: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAAAAGCAGGCTGGCAAGTGCTTTTTGAGACC R: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATTGTTGAAGGTGGCCAAG	439
592	F: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAAAAGCAGGCTAGTTCGCGCTTTTGTATGCT R: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTTGGCCAGTTCATCAGTT	474
1360	F: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAAAAGCAGGCTGACCCTGTCTCGTGCTAACG R: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCACCGCAAATGAAACACA	498
2132	F: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCTCATTGGTGGTGGTCTCA R: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTCGAAGCAGCTGGAGTG	500
2308	F: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAAAAGCAGGCTGTTTCGTCTTCGTATTTCTTGG R: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAACAACAAGCGCCTGCTGGG	253
2352	F: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAAAAGCAGGCTGATCGGTTTTGCGTTCGTATC R: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTACCTCCATCAGGGGTCAG	415
2594	F: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAAAAGCAGGCTTTGCTTCTCGTTTCCTTCGT R: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACGTTACCCTCGCATTCAAC	465
2779	F: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAAAAGCAGGCTGTTTCATCGGGTCGATTGATT R: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCATCGCAGCACTACTTTGA	467
4623	F: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAAAAGCAGGCTGCCCTCCACTACCACAGCTA R: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCAGCGGATCTAGCAAAGTA	416
9589	F: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAAAAGCAGGCTAATTCAGACGGGTCCACTTG R: GGGG <u>CCA</u> ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACACGGTGATCTGTCACCAA	468

3.7.2 Clonagem dos novos genes candidatos

Os novos genes alvos identificados a partir do transcriptoma de *T. absoluta* foram amplificados utilizando-se pares de *primers* específicos contendo seqüências de recombinação (Tabela 6). As reações de amplificação continham cerca de 40 ng de cDNA; 3 mM MgCl₂; 100 mM de cada dNTP; 1,5 U de *Taq* DNA polimerase em tampão adequado; e 0,2 µM de cada *primer* (Tabela 6), num volume de final de 20 µL. A amplificação foi conduzida em termociclador *Veriti* (Applied Biosystems) empregando as seguintes condições térmicas: 95° C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95° C por 30 s, 45-60° C (dependendo do contig) por 1 min e 72° C por 1 min, finalizando a 72° C por 5 min. Em seguida as amplificações foram analisadas por eletroforese em gel de 1% agarose. Os procedimentos subsequentes de purificação da banda do gel, clonagem em vetor pGEM-T *easy*, análises de digestão e sequenciamento foram realizadas de acordo com o item 3.3.5.

3.8 Ensaios de RNAi

Foram conduzidos ensaios de RNAi para os novos genes alvos selecionados de uma maneira similar ao descrito no item 3.4.2. Para efeito de comparação, neste novo ensaio também foram utilizados os 3 genes previamente clonados e descritos anteriormente (ATPase, AK e EcR). Folíolos de tomateiro ‘Santa-Clara’ foram colocados em recipiente para absorção de cerca de 10 µg de dsRNA de cada gene alvo mais o gene controle GFP em solução aquosa, e a seguir, cerca de 50 lagartas recém eclodidas de *T. absoluta* foram colocadas para se alimentar em cada folíolo, neste ensaio foram testados 5 novos genes, os 3 genes descritos anteriormente mais o gene controle GFP, em triplicata biológica. Após 5 dias de imposição do tratamento, 30 lagartas foram retiradas dos folíolos e pesadas em balança de precisão; o RNA total destas lagartas foi extraído para análise de expressão dos genes alvos de silenciamento. Os procedimentos de extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR foram feitos da mesma forma como descrito no item 3.4.3 e 3.4.4.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Escolha inicial de genes alvos para o silenciamento em *T. Absoluta*

Os receptores de Ecdisona (EcR) pertencem a superfamília de proteínas de receptores de hormônios esteróides, importante família de reguladores da transcrição envolvidos em diversos processos fisiológicos como controle do desenvolvimento embrionário, diferenciação celular e homeostase (SCHWABE; TEICHMANN, 2004). Em *Drosophila* o hormônio esteróide ecdisona desencadeia a metamorfose de larvas para adultos, em resposta a este hormônio o receptor se liga ao DNA com alta especificidade regulando a expressão de diversos genes (KOELLE et al., 1991). O gene EcR foi selecionado como candidato a alvo de silenciamento pelo critério essencialidade, baseado no seu papel decisivo durante o processo de ecdise em *Drosophila* onde larvas nocauteadas para EcR cessam o desenvolvimento durante os três primeiros estádios larvais (LI; BENDER, 2000). Como genes alvo candidatos, considerados como controle positivo, os genes codificantes da subunidade A da ATPase vacuolar (V-ATPase A) e da enzima Arginina Kinase também foram inicialmente selecionados. A bomba H⁺ATPase do tipo vacuolar é uma das enzimas mais fundamentais da natureza, estando presente em quase todas as células eucarióticas, e é responsável por energizar uma grande variedade de organelas e membranas (NELSON et al., 2000). Já a enzima Arginina kinase pertence a família de proteínas chamadas de transferases, que catalisam a transferência de grupos fosforil de alta energia de uma molécula de ATP para uma molécula de L-arginina, formando fosfoarginina, que é usada como um acumulador de energia (BRAGG et al., 2012). A seleção destes genes como alvos para este estudo, foi devido a resultados importantes obtidos acerca de RNAi previamente descritos, como por exemplo no controle de coleópteros em milho transgênico expressando o dsRNA da ATPase (BAUM et al., 2007), e por meio de dieta artificial com dsRNA da AK (ZHAO et al., 2008).

Devido a ausência destas sequências gênicas para *T. absoluta*, primers degenerados foram desenhados para os três genes (Tabela 1) baseados em sequências ortólogas obtidas de outros insetos de forma a permitir a amplificação e clonagem dos homólogos de *Tuta absoluta*.

4.2 Clonagem dos genes alvos

Foi obtido RNA total derivado de uma mistura de amostras de *T. absoluta* dos quatro estádios larvais mais o estágio de pupa. A amplificação dos cDNAs correspondentes aos

genes alvos para clonagem foi realizada empregando *Nested PCR* (Figura 5). De cada amplificação foram obtidos de 1 a 4 fragmentos, mas com predominância em intensidade de uma banda para cada um dos genes-alvo. Baseado em estimativa visual, o fragmento do gene EcR apresentou tamanho de cerca de 500 pb; Arginina kinase, cerca de 300 pb (Figura 5) e ATPase, cerca de 500 pb. Os fragmentos de interesse foram então recortados, purificados e clonados em vetor pGEM-T Easy. Foram selecionadas oito colônias brancas de cada transformação para análise. Os plasmídeos recombinantes foram extraídos por lise alcalina e digeridos com *EcoRI* para confirmar a presença e o tamanho correto dos insertos liberados pela digestão correspondente aos fragmentos amplificados e clonados. Após a confirmação da presença do inserto, a identidade dos clones foi confirmada por sequenciamento, empregando três clones de cada transformação.

De acordo com as sequências obtidas, os fragmentos dos genes clonados apresentavam o tamanho de 455 pb para EcR; 262 pb para Arginina Kinase; e 477 pb para ATPase. A cobertura da sequência clonada de acordo com as sequências codantes completas (CDS) do lepidóptera *Bombyx mori* foi de cerca de 17% para EcR (CDS de 2720 pb, número de acesso Genbank NM_001043866.1), cerca de 21 % para AK (CDS de 1270pb, número de acesso Genbank NM_001043937.1) e cerca de 21% para ATPase (CDS de 2265 pb, número de acesso Genbank EF114391.1). As sequências foram então traduzidas e alinhadas com sequências ortólogas utilizando o programa ClustalW2 para confirmação de identidade. O alinhamento das sequências deduzidas em aminoácidos dos genes EcR, Arginina Kinase e ATPase estão demonstrados na Figura 6.

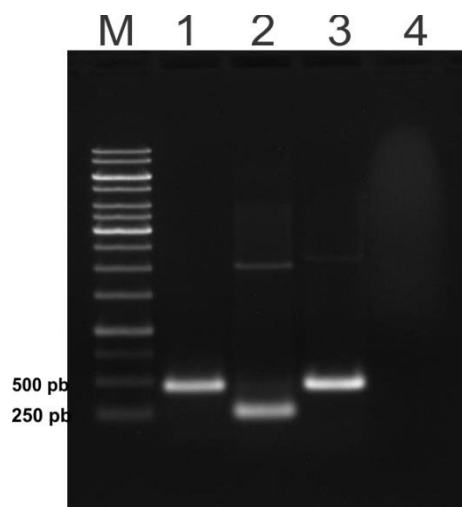


Figura 5 – Produtos de amplificação das reações de RT-PCR dos cDNAs dos genes Receptor de Ecdisona – EcR (~500 pb) (1) Arginina Kinase – AK (~300 pb) (2) e ATPase (~500) (3). Marcador de 1 Kb (M) e controle negativo (4) também são mostrados

Receptor de Ecdisona

```

Bicyclus anynana CAB63236.1 -----CEMDMYMRRKCQECRLKKCLAVG-MRPECVVPENQCAIKRKEKKAQREK
Spodoptera frugiperda AAM54494.1 NAVYICKFGHACEMDMYMRKQCQECRLKKCLAVG-MRPECVVPENQCAMKRKEKKAQREK
Helicoverpa armigera ACD74807.1 NAVYICKFGHACEMDMYMRKQCQECRLKKCLAVG-MRPECVVPENQCAMKRKEKKAQREK
Bombyx mori NP_001166846.1 NAVYICKFGHACEMDMYMRKQCQECRLKKCLAVG-MRPECVIQEPSKNKDRQR-QKKDKG
Danaus plexippus gb|EHJ66465.1 NAVYICKFGHACEMDMYMRKQCQECRLKKCLAVG-MRPECVVPENQCAIKRKEKKAQREK
Tuta absoluta -----YXIYMYMRRKCQVVSFKEVSSRGHVGR-CVVPETQCQIKRNEKKKQREK
          :***** :*: * : **: * . .*.: : :
          :***** :*: * : **: * . .*.: : :

DKLPVSTTTVDHMPAIMQCDDPPPEAARILECLQHEVVRFLSEKLLQNRNKNIPPLTANQQFLIARLVWYQDGYDQPSEEDLKRVTQTW
DKLPVSTTTVDHMPIMQCDDPPPEAARILGCLQHEVVRFLNEKLMQNRNKNVPPLTANQKSLIARLVWYQEGYEQPSEEDLKRVTQTW
DKLPVSTTTVDHMPIMQCDDPPPEAARI-----HEVVRFLNEKLMQNRNKNVPPLTANQKSLIARLVWYQEGYEQPSEEDLKRVTQTW
ILLPVSTTTVEDHMPIMQCDDPPPEAARI-----HEVVRFLSEKLMQNRNKNIPPLSANQKSLIARLVWYQEGYEQPSEEDLKRVTQTW
DKLPVSTTTVDHMPIMQCDDPPPEAARI-----HEVVRFLSEKLLQNRNKNIPALTSNQQFLIARLVWYQDGYEQPSEEDLKRVTQTW
DKLPVSTTTVDHMPIMQCDDPPPVSC-DXRS--GTTVPR--VSSW-QNRKNIPPLTANQQFLIARLVWYQDGYXHPSEEDLKRVTQTW
*****:***** :. .** . *** **: * : **: *****:*** :*:*****

QADTEEIGEASDLPFRQITEMILTIVQL
QSD--EDEEESDMPFRQITEMILTIVQL
QS-D-EDDESDMPFRQITEMILTIVQL
QSD--EDEEESDLPFRQITEMILTIVQL
QQTD-QDEEESDMPFRQITEMILTIVQL
QQAEEEEEGSSDLPFSQITVMX-----
* : **.* ** *

```

Arginina Kinase

```

Helicoverpa armigera gb|ADO2365 TEAQYKEME EKVSSTLSGLEGELKGTFFYPLTGM SKETQQQLIDDHFLFKEGDRFLQ
Heliothis virescens ADE27964.1 TEAQYKEME EKVSSTLSGLEGELKGTFFYPLTGM SKETQQQLIDDHFLFKEGDRFLQ
Spodoptera litura ADW94627.1 TEAQYKEME EKVASTLSGLEGELKGTFFYPLTGM SKETQQQLIDDHFLFKEGDRFLQ
Bombyx mori NP_001037402.1 TESQYKEMEDKVSSTLSGLEGELKGTFFYPLTGM SKETQQQLIDDHFLFKEGDRFLQ
Tribolium castaneum XP_971800.2 TEEQYKEME QVSSSTLSGLEGELKGTFFYPLTGM SKEVQKQLIDDHFLFKEGDRFLQ
Tuta absoluta -EAQYKEMEDKVSSTLSGLEGELKGTFFYPLTGM SKETQQQLIDDHFLFKEGDRFLQ
* *****:***: ***,*****:***:*****

AANACRFWPTGRGIYHNENKTFLVWCNEEDHLR
AANACRFWPSGRGIYHNENKTFLVWCNEEDHLR
AANACRFWPSGRGIYHNENKTFLVWCNEEDHLR
AANACRFWPTGRGIYHNENKTFLVWCNEEDHLR
AANACRFWPTGRGIYHNENKTFLVWCNEEDHLR
AANACRFWPTGRGIYHNENKTFLVWCNEEDHLR
AANACRFWPTGRGIFHNDAKTFLVWCNEEDHLR
*****:***:***:*****

```

V-ATPase subunidade A

```

Manduca sexta AY923835.1 DMTAIQVYEETSGVTGDPVLRRTGKPLSVELGPGILGSIFDGIQRPLKDINELTQSIYIP
Bombyx mori NP_001091829.1 DMTAIQVYEETSGVTGDPVLRRTGKPLSVELGPGILGSIFDGIQRPLKDINELTQSIYIP
Aedes aegypti XP_001659520.1 DMTAIQVYEETSGVTGDPVLRRTGKPLSVELGPGIMGSIFDGIQRPLKDINELTSSIIYIP
Drosophila melanogaster AAA61760.1 DMTAIQVYEETSGVTGDPVLRRTGKPLSVELGPGIMGSIFDGIQRPLKDINELTESIYIP
Tribolium castaneum XP_976188.1 EMATIQVYEETSGVTGDPVLRRTGKPLSVELGPGIMGSIFDGIQRPLKDINELTQSIYIP
Tuta absoluta -MATIQVYEETSYALSATPYCVASP-SPWLGPGILGSIFDGIQRPLKDISELTQSIHFP
*****:*** . . * ...* * *****:*****:***:***:***

INWLISYSKYMRLDDFYEKNYPEFVPLRTKVKEILQEEEDLSEIVQLVGKASLAETDKITLEVAKLLKDDFLQNSYSSYDRFCPFYKTVGM
INWLISYSKYMRLDDFYEKNYPEFVPLRTKVKEILQEEEDLSEIVQLVGKASLAETDKITLEVAKLLKDDFLQNSYSSYDRFCPFYKTVGM
INWLISYSKYMRLDDFYDKNFQEFVPLRTKVKEILQEEEDLSEIVQLVGKASLAETDKITLEVAKLLKDDFLQNSYSSYDRFCPFYKTVGM
INWLISYSKYMRLDDFYDKNFQEFVPLRTKVKEILQEEEDLSEIVQLVGKASLAETDKITLEVAKLLKDDFLQNSYSSYDRFCPFYKTVGM
INWLISYSKYTRALDDFYDKNFQEFVALRTKVKEILQEEEDLSEIVQLVGKASLAETDKITLEIAKLLKEDFLQNSYSSYDRFCPFYKTVGM
INWLISYSKYMRLDDFYDKNFQEFVPLRTKVKEILQEEEDLSEIVQLVGKASLAETDKITLEVAKLLKDDFLQNSYSSYDRFCPLKQYKQ---
*****:*****:***: ***,*****:*****:*****:*****:*****:***

```

Figura 6 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas dos fragmentos gênicos clonados dos genes alvos de *Tuta absoluta* com seqüências protéicas de outros insetos (espécie e *GenBank* ID mostrado no alinhamento)

4.3 Produção de dsRNA *in vitro*

A partir das seqüências moldes flanqueadas por sítios T7, foi realizada a síntese do dsRNA para os três genes alvo, ATPase (477 pb), EcR (455 pb), AK (262 pb) e GFP (276 pb) empregado como controle negativo. A qualidade das amostras de dsRNA foi verificada por eletroforese (Figura 7).

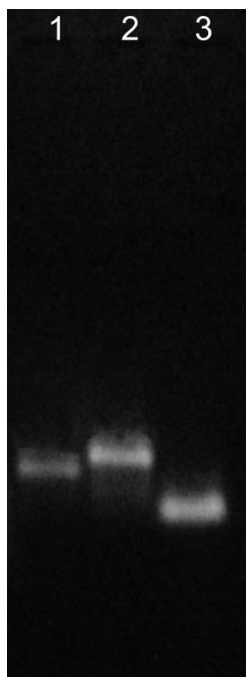


Figura 7 – Amostras de dsRNA, canaletas 1, 2 e 3 contém os dsRNA dos fragmentos dos genes Receptor de Ecdisona, ATPase e Arginina Kinase respectivamente, analisados em gel de agarose 1,5% desnaturante

4.4 Avaliação do silenciamento gênico por dsRNA em *Tuta absoluta* fornecido por dieta

Foram realizados dois ensaios de absorção de dsRNA para cada um dos três genes alvos propostos e o gene controle negativo GFP, cada um com duas réplicas biológicas. As lagartas de 1º instar de *T. absoluta* foram colocadas para se alimentar em folhas que absorveram 200 µL de solução contendo dsRNA na concentração de 25 ng µL⁻¹, em um total de 5 µg absorvidos. As lagartas foram coletadas 24 h, 48 h e 72 h após a imposição dos tratamentos e utilizadas para extração de RNA e síntese de cDNA. Os dados das análises da expressão dos genes-alvo das lagartas por RT-qPCR revelou que, quando alimentadas com folhas contendo dsRNA de fragmentos dos genes ATPase e EcR, houve uma redução significativa no acúmulo dos respectivos transcritos, progressivamente no tempo, em relação ao grupo controle, cujas lagartas se alimentaram de folhas do tomateiro que absorveram dsRNA de GFP (Figura8). Este silenciamento foi mais evidente no 1º ensaio para ambos os genes, que com 72 h de tratamento alcançou cerca de 20% da expressão em relação ao controle.

Já para o segundo ensaio observou-se um silenciamento que chegou a 50% para ATPase e para o gene EcR, não houve diferença de expressão com 72 h, porém observou-se uma tendência de silenciamento já que com 24 h os ensaios mostravam o gene EcR três vezes mais expresso que no grupo controle (Figura 8).

Em relação ao o gene AK, em ambos os ensaios não foi constatado um silenciamento gênico ou um padrão de silenciamento por isto não está sendo representado.

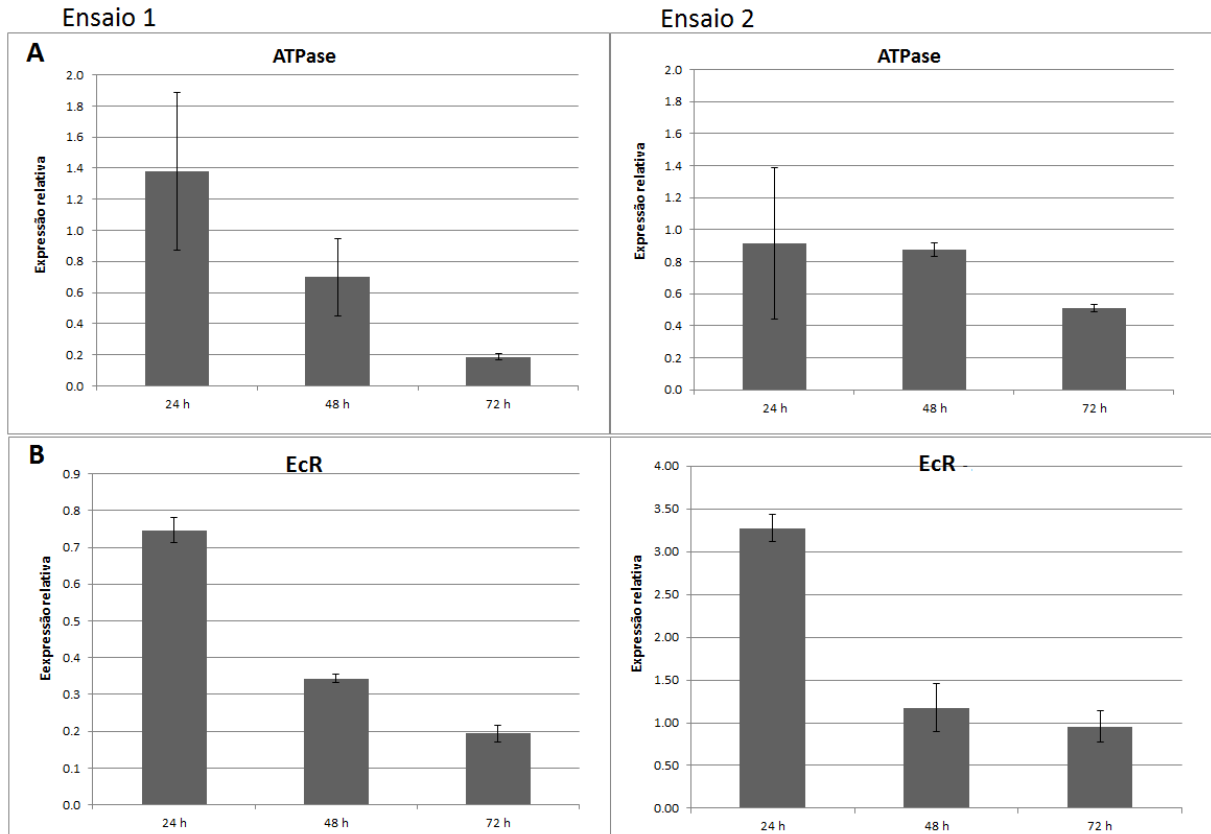


Figura 8 - Expressão relativa dos genes de lagartas de *Tuta absoluta* após alimentação em folhas de tomateiro que absorveram solução de dsRNA de dois genes, amostradas aos 24, 48 e 72 h após a imposição dos tratamentos em relação ao controle contendo dsRNA de GFP. Foram conduzidos dois ensaios independentes para ATPase (A) e EcR (B), com uma réplica biológica e as barras de erro mostram o desvio padrão entre as réplicas. Amostras foram normalizadas com o gene *Rpl5*

Também foram desenvolvidos ensaios de silenciamento gênico a partir da infiltração de folhas de tomateiro com suspensão de *Agrobacterium* contendo fragmento do gene alvo clonado de forma repetida e inversa (*hairpin*). Nesta abordagem, o fragmento clonado possui fragmentos inversamente complementares do gene alvo, que formarão moléculas dsRNA do gene alvo uma vez transcritas. Inicialmente, foi realizado um ensaio para demonstrar que folhas de tomateiro ‘Santa Clara’ seriam capazes de expressarem transientemente construções de *Agrobacterium* contendo gene repórter, realizando-se infiltração com eGFP (agroinfiltração). Este ensaio foi avaliado por meio da visualização de diversos pontos luminosos sob microscópio de fluorescência (Figura 9A). Em seguida, a técnica de silenciamento gênico pela abordagem de agroinfiltração foi testada a partir da co-infiltração das folhas com agrobactéria contendo GFPi, uma construção endereçada para o silenciamento

gênico de GFP por expressar um fragmento composto pelas duas metades inversamente complementares deste gene repórter. Este teste resultou em uma drástica inibição da fluorescência de GFP (Figura 9B). Esse ensaio infiltração e co-infiltração de tomateiro indicou a viabilidade dessa abordagem para ensaio de silenciamento gênico por meio da expressão transiente de versões *hairpin* dos genes alvo como uma alternativa ao ensaio de silenciamento por dieta pela absorção de dsRNA.

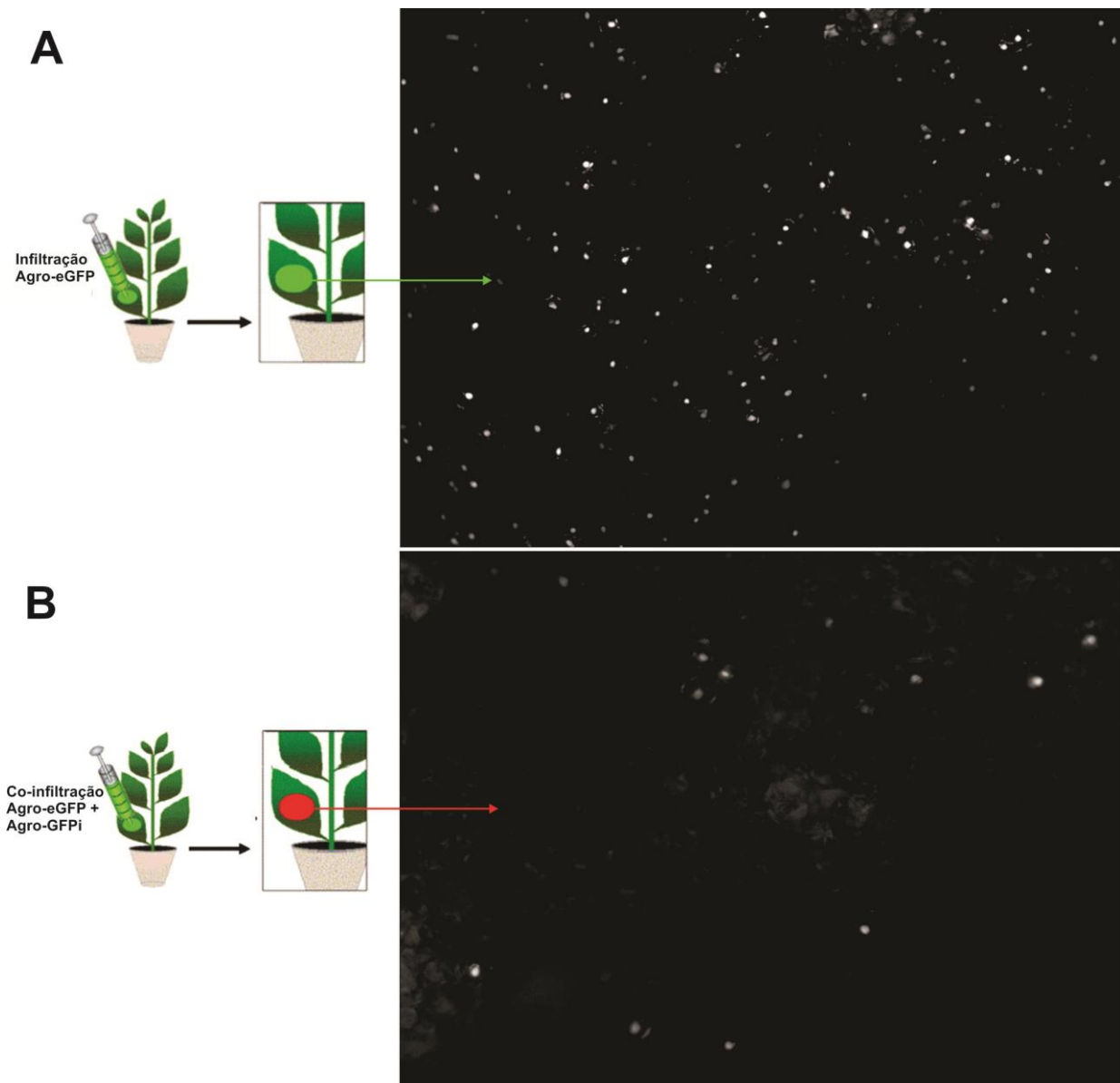


Figura 9 - Experimento de agroinfiltração com as bactérias eGFP e GFPi. Diagrama indicativo do experimento, seguida de microfotografia de fluorescência com aumento de 100X, indicando diversos pontos fluorescentes (A) devido a infiltração com a bactéria eGFP, e (B) redução nos pontos fluorescentes devido ao silenciamento pela co-infiltração com a bactéria GFPi

Estes ensaios de agroinfiltração foram então realizados para os genes ATPase e AK, para o gene EcR não foi possível a obtenção do vetor de transformação de plantas, portanto não foi conduzido este experimento.

As análises da expressão gênica por RT-qPCR das lagartas revelou que, quando alimentadas por folhas agroinfiltradas com as versões *hairpin* de ambos os genes ATPase e AK, as lagartas apresentaram redução significativa dos respectivos transcritos, em relação ao grupo controle, cujas lagartas se alimentaram de folhas do tomateiro com expressão transiente de GFPi (Figura 10). Para o gene ATPase os ensaios foram bastante similares, apresentando uma redução gênica progressiva no tempo (com exceção da amostra de 48h no ensaio 1, que apresentou uma grande variação entre as réplicas), que chegou a cerca 20% da expressão em relação ao controle, interessante um valor muito parecido ao obtido para o ensaio 1 do experimento de absorção de dsRNA descrito anteriormente. Já os ensaios para o gene AK, apesar de uma oscilação na quantidade de transcritos nos períodos de 24 e 48 h, ambos apresentaram uma redução dos transcritos no período de 72 h que chegou a cerca de 60% e 80%, nos ensaios 1 e 2 respectivamente, em relação ao controle.

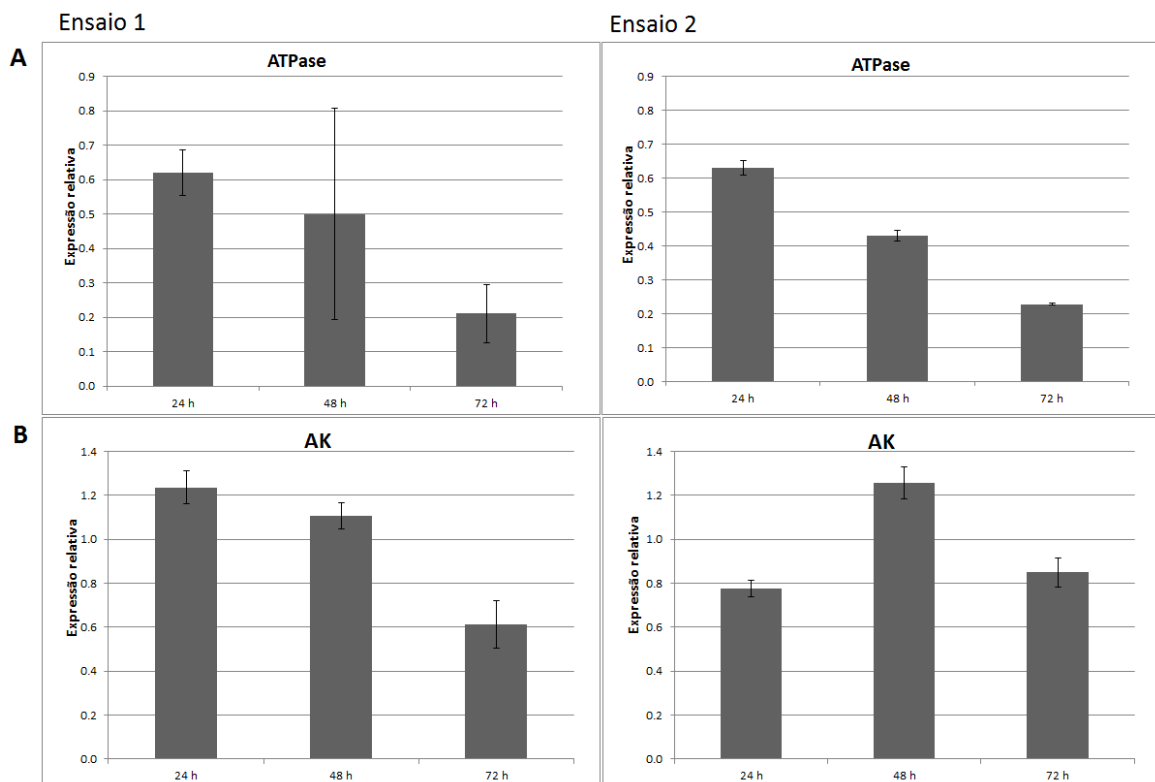


Figura 10 - Expressão relativa dos genes de lagartas de *Tuta absoluta* após alimentação em folhas de tomateiro infiltradas com *Agrobacterium* contendo vetor expressando siRNA de dois genes, amostradas aos 24, 48 e 72 h após a imposição dos tratamentos em relação ao controle contendo dsRNA de GFP. Foram conduzidos dois ensaios independentes para ATPase (A) e AK (B), com uma réplica biológica, a barra de erros mostra o desvio padrão entre as amostras. As amostras foram normalizadas com o gene *Rpl5*

Com o intuito de avaliar o efeito do silenciamento gênico de dsRNAs no ciclo de vida da *T. absoluta*, foram realizados ensaios onde as lagartas foram alimentadas em folhas que absorveram dsRNA dos genes alvo em solução aquosa, sendo realizada análise visual do inseto durante o seu desenvolvimento. No primeiro ensaio, 20 lagartas recém eclodidas (1º instar) foram colocadas por tratamento em folhas de tomateiro que absorveram dsRNA dos respectivos genes alvos (Figura 11). Pela contagem do número de lagartas 11 dias após imposição dos tratamentos foi possível observar maior letalidade das lagartas sob o tratamento de dsRNA, com o total de lagartas igual a 11 (45% de mortalidade) para AK, 14 (30% de mortalidade) para EcR e 9 (55% de mortalidade) para ATPase em comparação ao controle GFP com 16 lagartas (20% de mortalidade).

Através da avaliação visual das lagartas sobreviventes, pode-se observar um retardo no desenvolvimento em todos os tratamentos de RNAi, pois enquanto no controle todas as lagartas se encontram em 4º instar, nos tratamentos de RNAi observam-se lagartas menores, provavelmente de 3º instar, sendo que no tratamento com o dsRNA do gene EcR observa-se que não há nenhuma lagarta de 4º instar (Figura 11A). Estas lagartas ainda foram observadas ao longo da metamorfose e a contagem de pupas mostrou maior mortalidade nos tratamentos em relação ao controle (Figura 11A e B), assim como durante a emergência dos adultos de seus casulos (Figura 11B).

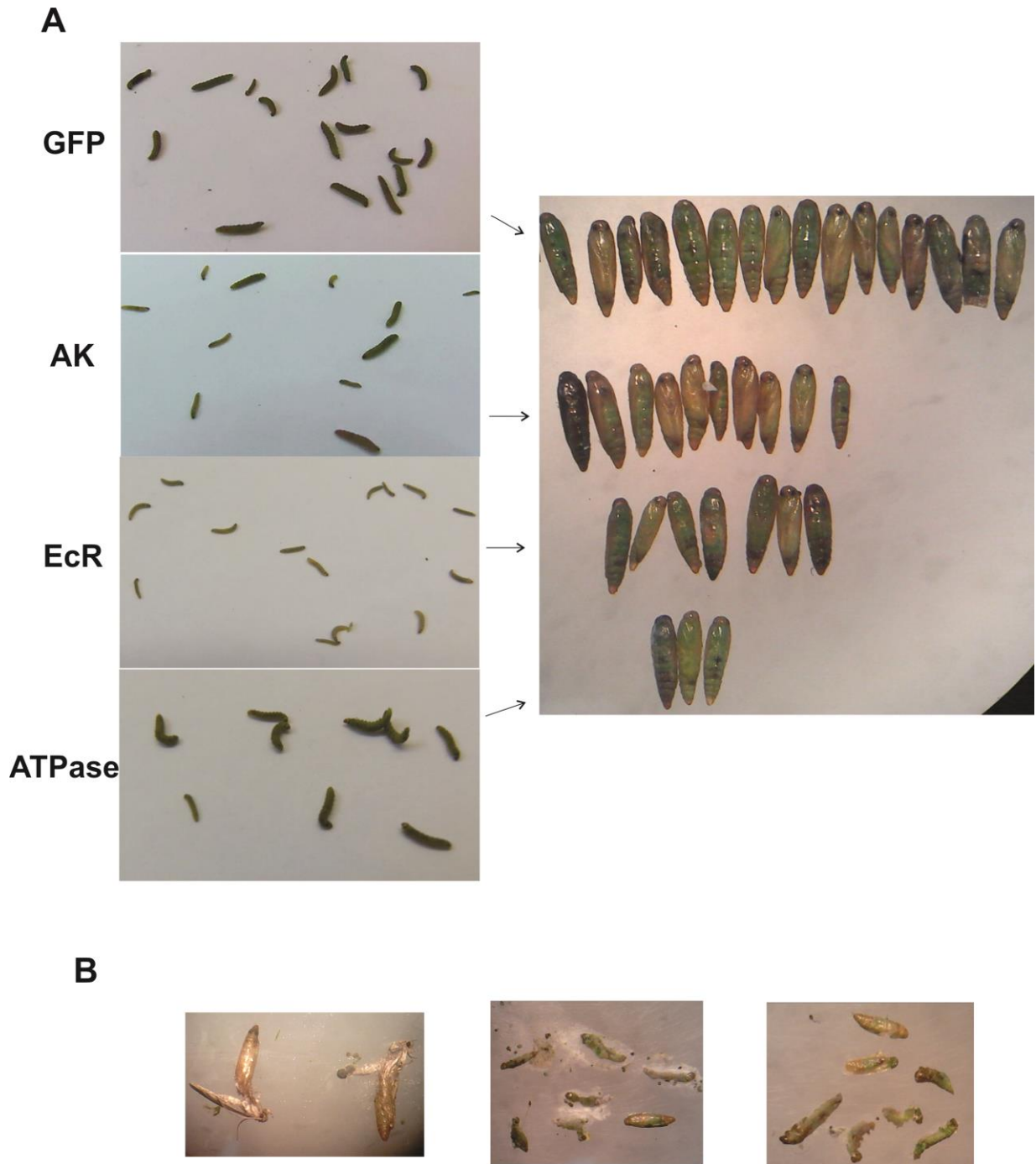


Figura 11 - Ilustrações de exemplares de *Tuta absoluta* obtidas em experimento de absorção de dsRNA. Lagartas retiradas das folhas após 11 dias de alimentação com o dsRNA dos genes GFP, AK, EcR e ATPase seguidas das respectivas pupas que se formaram (A). Fotos de fenótipos deletérios observados neste experimento provavelmente devido ao tratamento com dsRNA (B)

Num segundo ensaio, cinco lagartas foram colocadas para se alimentar em folíolos que absorveram quantidades crescentes de dsRNA para cada um dos três genes alvo, avaliando-se o nível de dano nos folíolos diariamente por até 11 dias (Figura 12). Pode ser observado um expressivo efeito do tratamento com dsRNA dos três genes alvo, com redução do dano dos

folíolos tratados em relação ao grupo controle (Figura 12). De um modo geral, o efeito da proteção foi dose-dependente, mas alguns dos genes testados já apresentaram um efeito evidente mesmo em doses mais baixas, como por exemplo no ensaio 2 dos genes ATPase e EcR. (Figura 12).

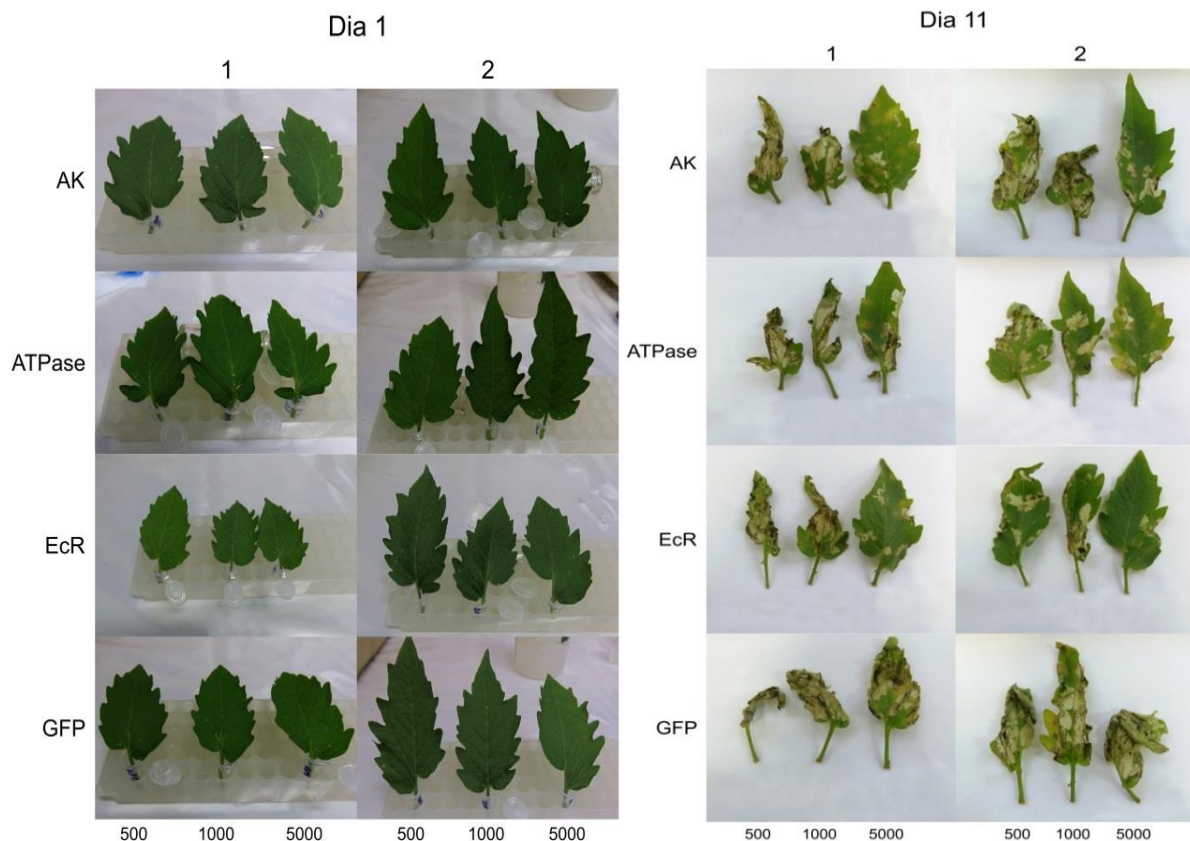


Figura 12 - Folíolos com as lagartas se alimentando, no 1º e 11º dia após absorção de crescentes concentrações (500, 1000 e 5000 ng) de dsRNA dos genes-alvo e o gene controle GFP. Após 11 dias de alimentação observa-se menos danos aos folíolos que receberam dsRNA dos genes-alvo em comparação com GFP

4.5 Construção de vetores para a produção de plantas transgênicas expressando produtos de silenciamento em *T. absoluta*

Com o intuito de produzir vetores de expressão capazes de expressar versões *hairpin* dos genes alvos em plantas do tomateiro, *primers* específicos para os genes-alvo foram desenhados de forma a produzir fragmentos amplificados (amplicons) flanqueados pelas sequências *attL1* e *attL2* (Tabela 3), que, uma vez clonados no vetor pGEM-T, possibilitam a recombinação direta com o vetor binário pK7GWIWG2(I) (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002). Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel indicando que foram obtidos fragmentos com tamanho esperado para os genes incluindo as sequências de recombinação.

Estes fragmentos foram então purificados, quantificados e utilizados nas reações de recombinação com o vetor pK7GWIWG2(I). O produto das reações foi utilizado para a transformação de bactérias *E. coli* e, após o crescimento em placas contendo meio seletivo, as colônias selecionadas foram utilizadas para a extração de DNA plasmidial para validação da inserção dos fragmentos gênicos no sentido correto. Para tal, DNA plasmidial de todas as clonagens foram digeridos com enzima de corte único. Aquelas amostras que apresentaram tamanho correto após esta digestão foram digeridas com até três enzimas distintas de forma a definir o sentido correto de inserção dos fragmentos, comparando com padrões obtidos para plasmídeo não transformado. Como exemplo, a Figura 13 ilustra as digestões do clone contendo o gene AK no sentido correto. Os clones positivos para o inserto com a direção correta foram também confirmados por amplificação empregando os iniciadores utilizados para clonagem e por sequenciamento (não mostrado). Dentre os genes avaliados, não foi possível obter clone para o gene EcR corretamente recombinado

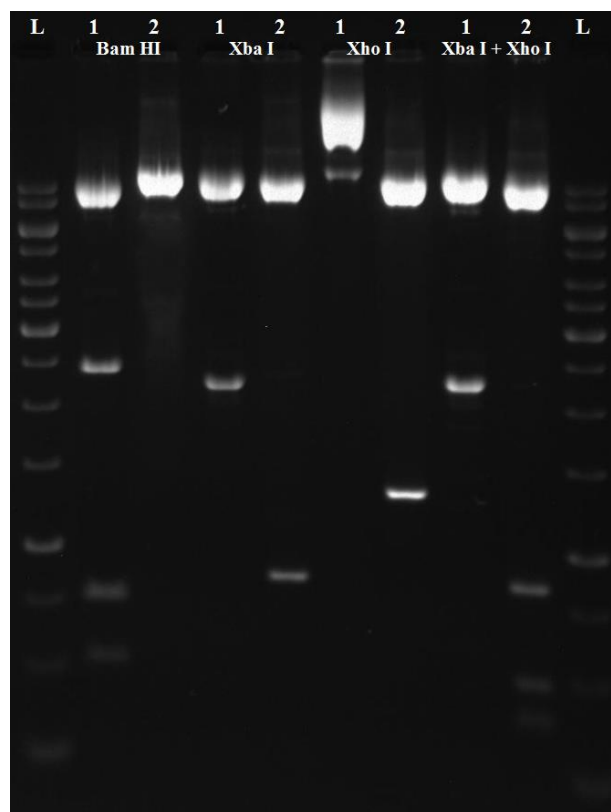


Figura 13 – Produtos das reações de digestão do vetor pK7GWIWG2 antes (1) e depois (2) da inserção do gene AK, com três enzimas de restrição (*Bam*HI, *Xba*I, *Xho*I) e a dupla digestão (*Xba*I e *Xho*I). L: ladder de 1 Kb em gel de agarose 0,7%

4.6 Produção de tomateiro transgênico

A partir da clonagem dos fragmentos para os genes ATPase (477 pb) e Arginina Kinase (260 pb) em pK7GWIWG2(I) foram realizados 4 experimentos de transformação genética da cultivar ‘Micro-Tom’ e os resultados de eficiência de transformação estão sumarizados na tabela 7. O primeiro experimento não produziu plantas regenerantes, assim como o segundo experimento para o gene AK, pois todas as placas com os explantes foram perdidas por proliferação de agrobactéria.

Tabela 7 - Sumário dos resultados dos quatro experimentos de transformação realizados

Experimentos de transformação genética	Nº de explantes inicial transformados com AK	Nº de explantes iniciais transformados com ATPase	Nº de regenerantes a partir da transformação AK	Nº de regenerantes a partir da transformação ATPase	% Eficiência de transformação com AK	% Eficiência de transformação com ATPase
1	360	300	0	0	0,0%	0,0%
2	400	400	0	18	0,0%	4,5%
3	500	280	32	53	6,4%	18,9%
4	400	400	14	44	3,5%	11,0%
Total de plantas regenerantes			46	115		

Os valores de eficiência de transformação obtidos nestes experimentos variaram entre 3% e 19%, abaixo dos descritos previamente que variaram de 20% até 56% (PINO et al., 2010). Outro fato que se pode destacar é o tempo total observado, desde a transformação até a obtenção de sementes T₀, nos nossos ensaios este tempo foi de cerca de 100 dias (Figura 14), enquanto os dados na literatura mostram 65 dias (PINO et al., 2010).

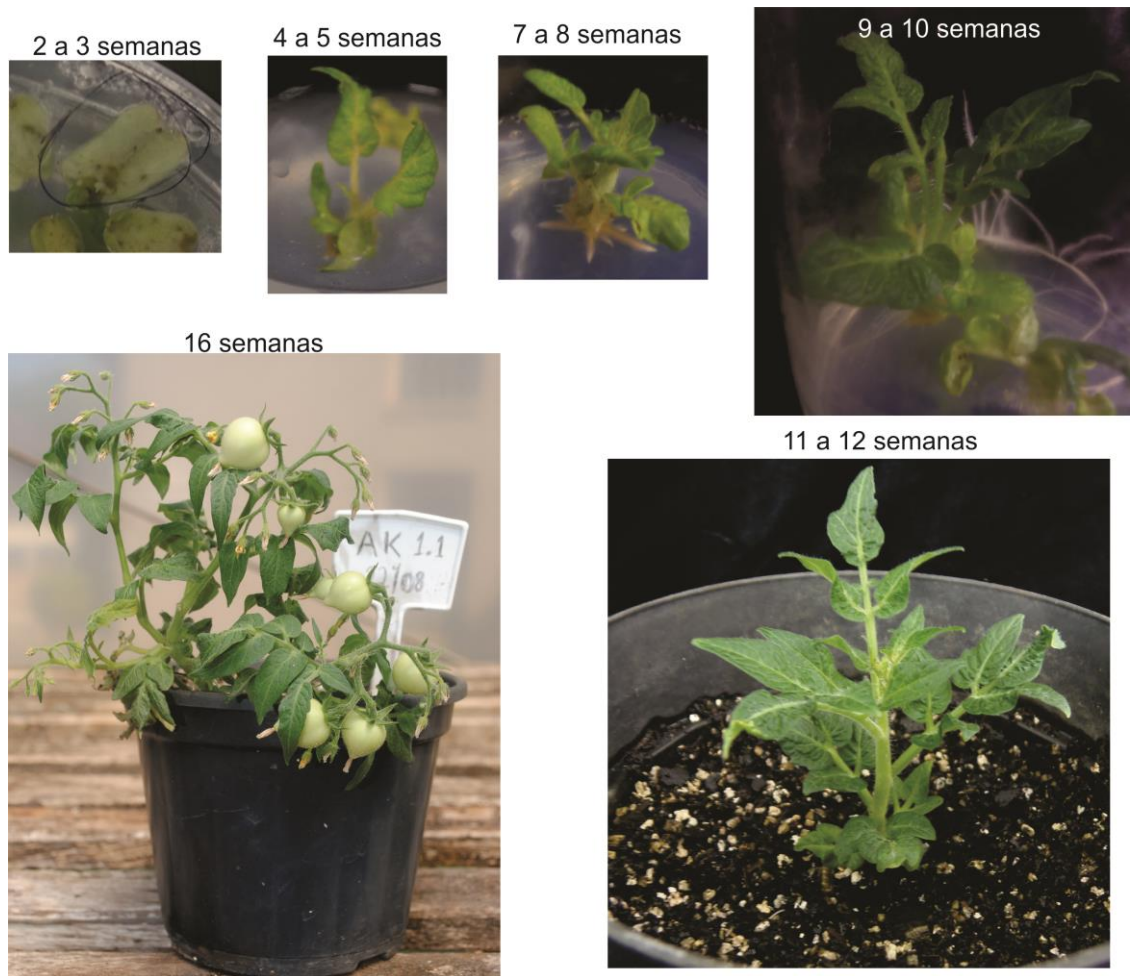


Figura 14 – Prancha de fotos com todas as etapas e a duração de cada uma delas, a partir da transformação até a obtenção de sementes T0

As plantas regenerantes foram aclimatadas e a seguir foram testadas para confirmação preliminar da transformação por amplificação do cassete inserido com os genes ATPase e AK (Figura 15 e 16). Quando duas ou mais plantas se originam de um mesmo explante, elas podem ser oriundas do mesmo evento de transformação, e portanto foram designadas com o mesmo numeral seguido de um segundo numeral para serem diferenciadas entre elas.

Dos experimentos de transformação com o gene ATPase, um total de 13 plantas, de provavelmente 11 eventos de transformação foram analisadas, sendo que 8 delas apresentaram amplificação do fragmento de DNA inserido com tamanho correto esperado, demonstrando ser presumivelmente transgênicas. Já para os experimentos de transformação com o gene AK, um total de 9 plantas de 6 eventos foram analisadas e todas elas apresentaram amplificação do fragmento inserido com tamanho correto esperado.

Este número de plantas avaliadas é menor que o total de regenerantes observado, pois diversas delas ainda se encontravam em estado inicial de regeneração *in vitro*, e portanto

ainda não foram avaliadas. Também contribui para esse número menor as perdas de plantas que ocorrem naturalmente por contaminação ou no processo de aclimatização.

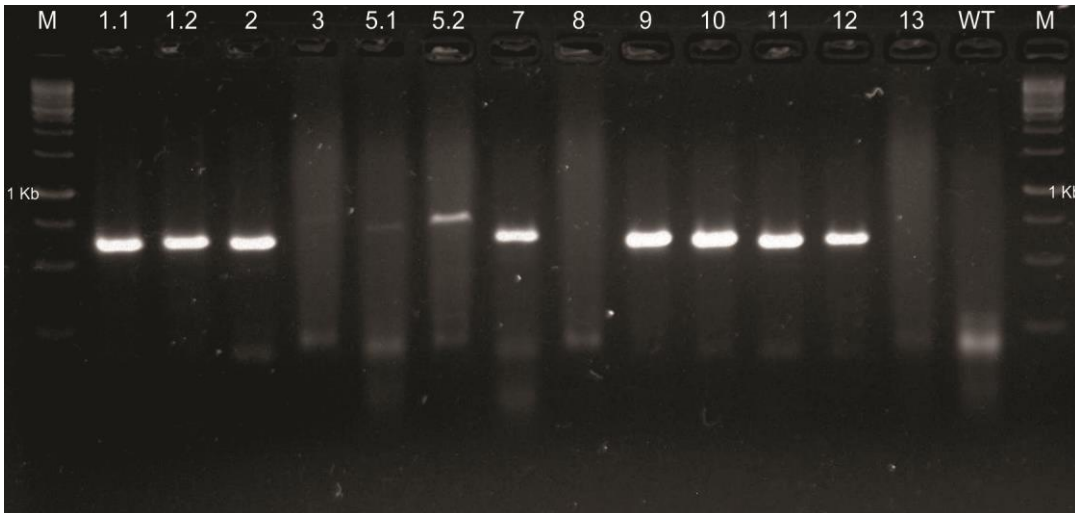


Figura 15 –Produtos de amplificação do DNA genômico das plantas regenerantes transformadas com o gene ATPase separados por eletroforese em gel de agarose 1%. Os números das canaletas designam cada uma das plantas, as que possuem o mesmo 1º número podem pertencer ao mesmo evento de transformação. WT DNA da planta selvagem e M marcador molecular de 1 Kb

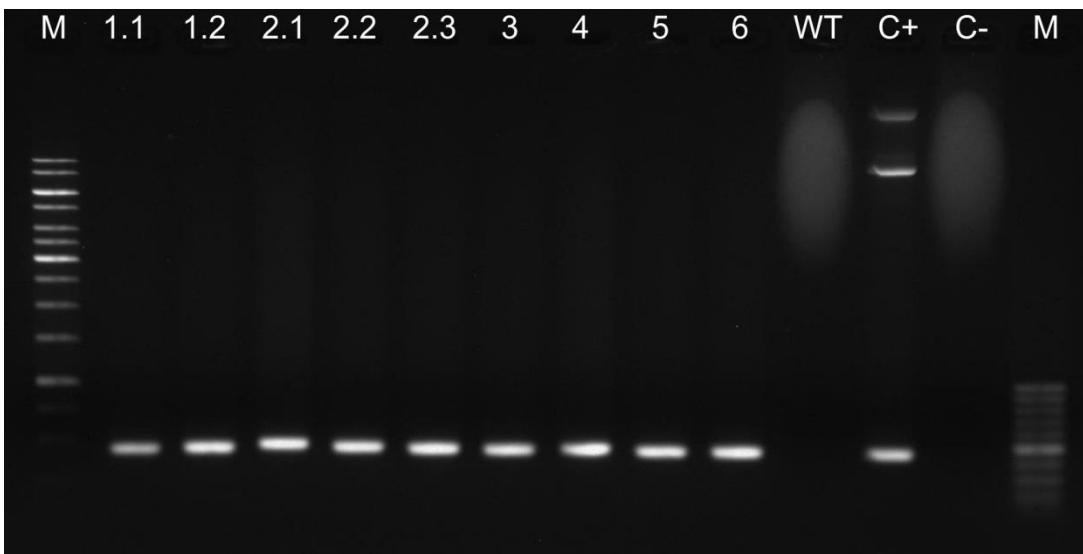


Figure 16 – Produtos de amplificação do DNA genômico das plantas regenerantes transformadas com o gene AK separados por eletroforese em gel de agarose 1%. Os números das canaletas designam cada uma das plantas as quais foram originados o DNA, as que possuem o mesmo número foram originadas do mesmo explante e portanto podem pertencer ao mesmo evento de transformação. WT DNA da planta selvagem, C+ controle positivo (vetor de transformação), C- controle negativo e M marcador molecular de 1 Kb e 100 pb respectivamente

As plantas transgênicas PCR positivas, de um total de 8 para o gene ATPase e de 9 para o gene AK, foram verificadas quanto a presença do transcrito relativo a expressão do transgene via RT-PCR *primer* específico (Figura 17 e 18). Esta análise mostrou a presença do transcrito oriundos da expressão do transgene em todas as 8 plantas testadas para o gene ATPase e em 6 plantas testadas para o gene AK (2.1, 2.2, 2.3, 3, 5 e 6) (Figura 17 e 18). Esta análise mostra que além de serem transgênicas as plantas estão expressando o gene inserido.

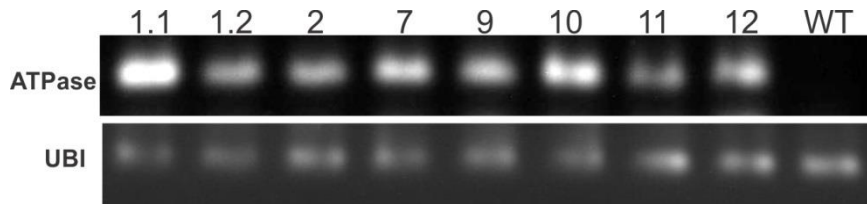


Figura 17 – Produtos de amplificação da RT-PCR gene específico para ATPase e controle endógeno Ubiquitina (UBI) separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os números designam as diferentes plantas e os números iguais mostram as plantas que podem ser do mesmo evento de transformação, WT planta controle tipo selvagem

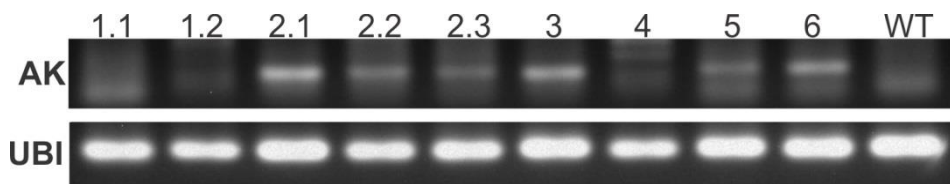


Figure 18 – Produtos de amplificação da RT-PCR gene específico para AK e controle endógeno Ubiquitina (UBI) separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os números designam as diferentes plantas e os números iguais mostram as plantas que podem ser do mesmo evento de transformação, WT planta controle tipo selvagem

Todas as plantas transgênicas PCR positivas (8 ATPase e 9 AK) também foram testadas por meio da técnica de *stem loop pulsed* RT-PCR (VARKONYI-GASIC et al, 2007) (Figuras 19 e 20) para identificação de um potencial siRNA, selecionado por meio de análise virtual (Tabela 4), produto do processamento do dsRNA pela maquinaria de silenciamento da planta. De acordo com as análises foi possível identificar a presença do siRNA em todas as plantas transgênicas testadas para ambos os genes, com exceção para a planta AK 4. Neste caso as análises de RT-PCR gene específico já haviam mostrado a ausência do transcrito neste evento (AK 4), que apesar de ser PCR positiva, pode não estar expressando o cassete inserido. Já para as eventos AK 1.1 e 1.2 que não apresentaram o transcrito nas análises de RT-PCR, mas o ensaio de *stem loop pulsed* RT-PCR indicou a presença do siRNA, podem ter falhado em alguma etapa do RT-PCR.

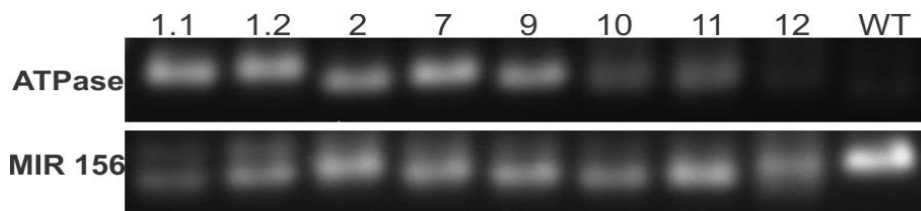


Figura 19 – Produtos de amplificação pela técnica de *stem loop pulsed RT-PCR* para o siRNA do fragmento gênico da ATPase e do gene controle microRNA 156 (MIR 156) separados por eletroforese em gel de agarose 3%. Os números significam os eventos de transformação, WT planta controle tipo selvagem

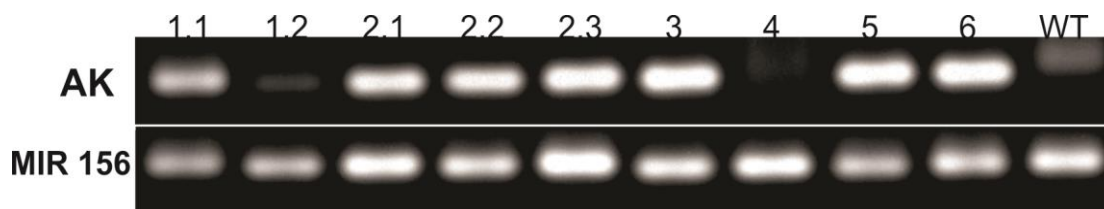


Figure 20 - Produtos de amplificação pela técnica de *stem loop pulsed RT-PCR* para o siRNA do fragmento gênico da AK e do gene controle microRNA 156 (MIR 156) separados por eletroforese em gel de agarose 3%. Os números significam os eventos de transformação, WT planta controle tipo selvagem

4.7 Ensaio preliminar de herbivoria em plantas transgênicas expressando RNAi

Este ensaio preliminar teve como objetivo avaliar o efeito do contínuo fornecimento de dsRNA dos genes ATPase e AK de *Tuta absoluta* no desenvolvimento do inseto, produzidos em tomateiros transgênicos na geração T₀ e fornecidos as lagartas via herbivoria. Esse efeito foi observado por meio de avaliação visual do dano as folhas, da mortalidade por meio da contagem dos sobreviventes, e por meio da observação de fenótipos deletérios como peso e tamanho (Figura 21).

Pela análise visual pode-se observar que aos 7 dias de experimento a folha do tipo selvagem (controle) encontra-se completamente danificada, enquanto que as folhas dos tomateiros transgênicos ainda possuem áreas intactas (Figura 21A). Pela contagem dos sobreviventes, 100% das lagartas que se alimentaram no tomateiro controle alcançou o estágio de pupa, enquanto este número alcançou 70%, 70%, 60% e 60% nas lagartas alimentadas nas folhas dos eventos ATPase 1.1, ATPase 7, ATPase 9 e AK 1.1, respectivamente (Figura 21B). Por meio da análise visual das pupas, pode-se perceber uma nítida diferença de tamanho estimado em miligramas entre o grupo de pupas que se alimentaram com a planta controle com os grupos de pupas dos diversos eventos transgênicos (Figura 21B); esta observação pode ser corroborada pelo peso médio aferido para estes grupos de pupas (Figura 20C), indicando grande variação nos dois extremos, sendo a maior pupa com 4,6 mg (do grupo controle) e a menor pupa com 0,9 mg (do tratamento AK 1.1) (Figura 21D).

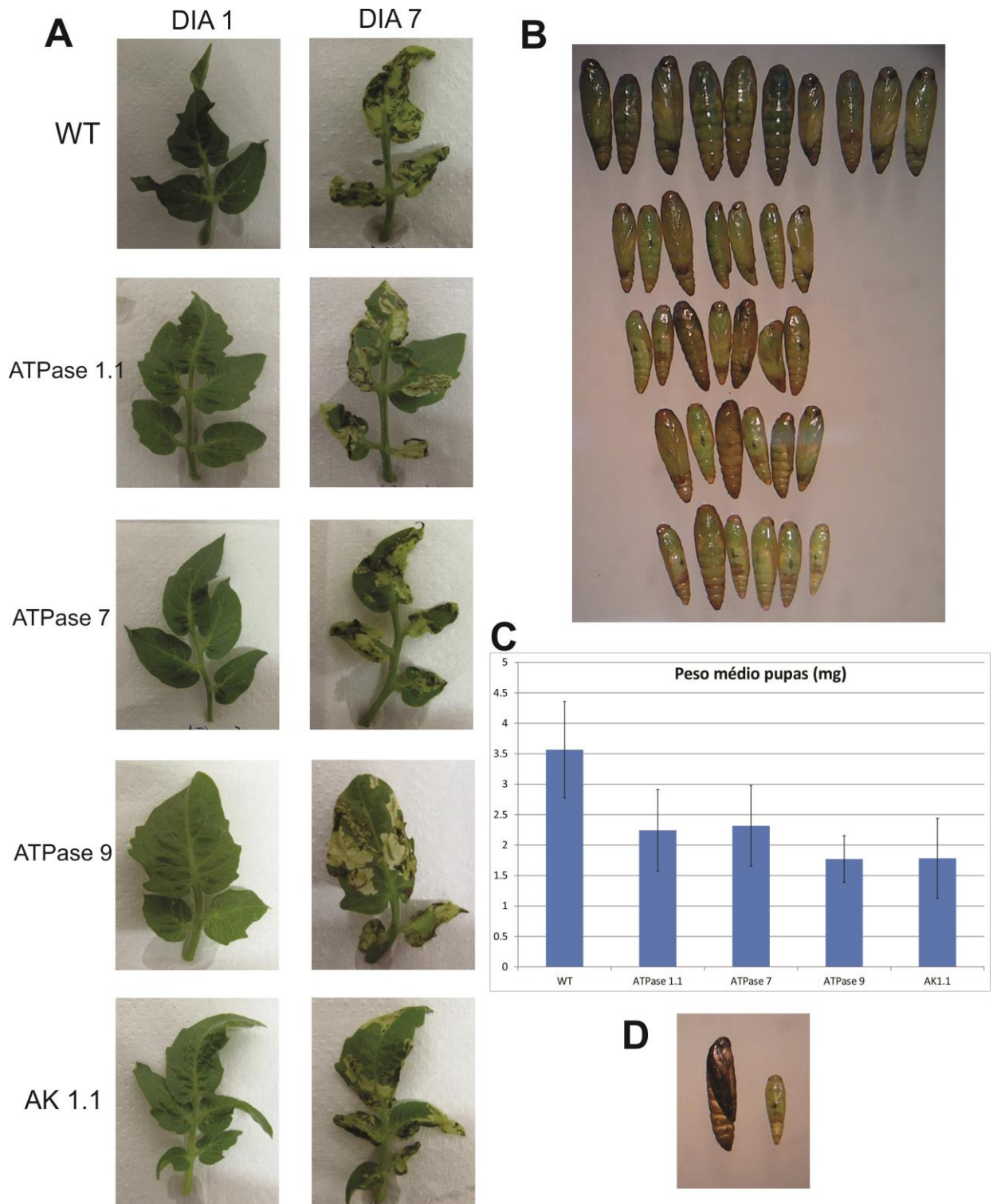


Figure 21 – Prancha de fotos com os resultados dos experimentos de herbivoria. Fotografias das folhas de tomateiro ‘Micro-Tom’ transgênicas e WT no 1º e 7º dia de experimento (A), fotografia das pupas originadas das lagartas que se alimentaram nas folhas em A (B), gráfico com o peso médio das pupas ilustradas em B, com a barra de erros mostrando o desvio padrão (C) e fotografia da maior e menor pupa observada

Para este ensaio de herbivoria, como foram utilizadas as plantas transgênicas T_0 , foram escolhidas somente as mais vigorosas dentre as positivas para os experimentos

anteriores (PCR, RT-PCR específica e *stem loop* RT-PCR), as quais foram possíveis a retirada de folhas sem o comprometimento de seu desenvolvimento completo, afim de se obter frutos com sementes para dar continuidade a linhagem transgênica.

4.8 Análise transcriptômica massal de diversas fases de desenvolvimento de *Tuta absoluta*

4.8.1 *De novo assembly*, estimativa da expressão gênica e anotação

Foram preparadas cinco bibliotecas de *T. absoluta*, derivadas de RNA total extraído de ovos, 1^o. 2^o. 3^o. e 4^o. Ínstars e indivíduos adultos (Figura 4). Essas amostras foram sequenciadas e os dados gerais obtidos a partir de RNA-seq encontram-se resumidos na Tabela 8. O sequenciamento gerou uma quantidade massiva de sequências, foram obtidos um total de cerca de 24,7 bilhões de bases e cerca de 245 milhões de leituras (reads), variando entre 34 e 55 milhões de *reads* por biblioteca (2^o instar e ovo respectivamente). De modo geral, todas as bibliotecas demonstraram boa qualidade, evidenciado pelos parâmetros Q20 e Q30, que representam uma predição da probabilidade de um erro na escolha (*base call*) de determinada base. Esses índices indicam, respectivamente, 99% e 99,9% de precisão na definição da base. Portanto para o sequenciamento em questão, todas as bibliotecas possuem cerca de 94% das bases com 99% de precisão e cerca de 87% das sequências com 99,9% de precisão da escolha das bases. Os dados indicam ainda que o transcrito de *Tuta absoluta* apresenta cerca de 44% de bases G+C.

Tabela 8 – Resultados gerais derivados do RNA-seq das bibliotecas obtidas por sequenciamento, expressas em total de bases geradas; número total de *reads*; porcentagem de bases G e C e qualidade das bases para cada fase de desenvolvimento dos dados gerados pelo RNA-seq

Bibliotecas	Total de Bases	Número Total de	%GC	Q20 (%)	Q30 (%)
		<i>reads</i>			
Ovo	5.626.900.284	55.711.884	43,5	94,4	87,4
1 ^o Instar	3.718.827.070	36.820.070	41,2	94,8	88,0
2 ^o Instar	3.497.118.738	34.624.938	43,9	94,2	87,0
3 ^o Instar	4.469.182.734	44.249.334	45,2	93,9	86,4
4 ^o Instar	3.759.123.848	37.219.048	45,9	94,1	86,6
Adulto	3.668.050.734	36.317.334	44,0	94,0	86,5
Total/Média	24.739.203.408	244.942.608	43,95	94,23	86,98

As análises realizadas empregando *CLC Genomics Workbench* permitiram o alinhamento dos *reads* de todas as fases de desenvolvimento. O alinhamento geral dos *reads* (*de novo assembly*) gerou um total de 113.913 contigs, com o maior contig medindo 11.765 pb, o menor 200 pb e uma média de 539 pb. Este número total de contigs é muito superior ao que seria esperado para um total de genes predito para esta espécie, comparando-se com outros insetos que tiveram seu genoma sequenciado, como *Bombyx mori*, também um Lepidoptera, que possui 18.501 genes (XIA et al., 2004); ou *Drosophila melanogaster* (ordem Diptera), que possui 13.379 genes (ADAMS et al., 2000); ou *Tribolium castaneum* (Coleoptera), que possui 16.404 genes (RICHARDS et al., 2008). Isto se deve ao fato de que a reconstrução de um transcrito completo por meio de *reads*, sem um genoma de referência (*de novo assembly*), resulta em significativo desafio computacional (HASS; ZODY, et al, 2010). Além disso, o *software* CLC não foi desenhado especificamente para a tarefa de alinhamento sem um genoma de referência, como outros softwares disponíveis, tais como *Trinity* (GRABHEER et al., 2011) e *Oases* (SCHULZ et al., 2012). Apesar disto, com o alinhamento realizado pode-se chegar a contigs que possivelmente representam genes altamente expressos de *Tuta absoluta* e, portanto foi possível chegar a uma lista de possíveis genes alvos.

Na próxima etapa, cada arquivo FASTQ contendo as sequências de cada uma das fases de desenvolvimento, foi alinhado novamente com o transcrito gerado para obtenção dos valores de *gene counts*, determinado pelo número de *reads* que foi mapeado a um contig/gene. Com base nos valores desses *gene counts*, foram obtidos os valores de RPKM (*Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads*; MORTAZAVI et al., 2008) para cada contig em cada fase de desenvolvimento, que é uma estimativa de valores normalizados da expressão gênica. Com base nestes valores, é possível identificar contigs que são altamente expressos em cada fase de desenvolvimento, identificando aqueles diferencialmente expressos entre as fases, e portanto realizar uma análise mais precisa para a escolha dos próximos genes alvos de silenciamento por RNAi.

Cerca de 100 contigs mais expressos nos primeiros estádios larvais foram analisados por meio de BLAST para identificar possíveis homologias e investigar se o alinhamento possui sentido. Cerca de 80% dos contigs analisados possuíam similaridades com sequências proteicas de outros insetos mostrando a veracidade do alinhamento (dado não mostrado). Excluindo-se contigs que possuíam similaridade com proteínas ribossômicas, que por serem extremamente conservadas, não são alvos apropriados, os outros contigs representam genes potencialmente alvos para controle de pragas por silenciamento gênico. A partir desta análise

foram escolhidos outros genes alvo para investigação do potencial de inibição do desenvolvimento de *Tuta absoluta*.

Um outra montagem do transcrito foi também conduzida empregando o software *Trinity* (GRABHEER et al., 2011) mais adequado para a tarefa da montagem *de novo*. após a aplicação de um filtro para remoção das sequências de baixa qualidade (sequências filtradas), o tamanho das bibliotecas reduziu em 5% a 15% do tamanho total (figura 22). Os fragmentos filtrados foram então utilizados para a montagem do transcrito de referência e para a análise de expressão gênica. Para a montagem *de novo* do transcrito de *T. absoluta*, as regiões com alta densidade de fragmentos foram reduzidas para 25 fragmentos por região, reduzindo o tamanho das bibliotecas sequenciadas para um conjunto com tamanho variando entre 26% a 39% do total de cada biblioteca (montagem; figura 22). Essa segunda montagem do transcrito de referência de gerou 93.477 contigs com tamanho mínimo de 300 pb. O tamanho do transcrito de referência foi de 147.141.189 nucleotídeos (147 Mb), com contigs de tamanho médio igual a 1.574 pb.

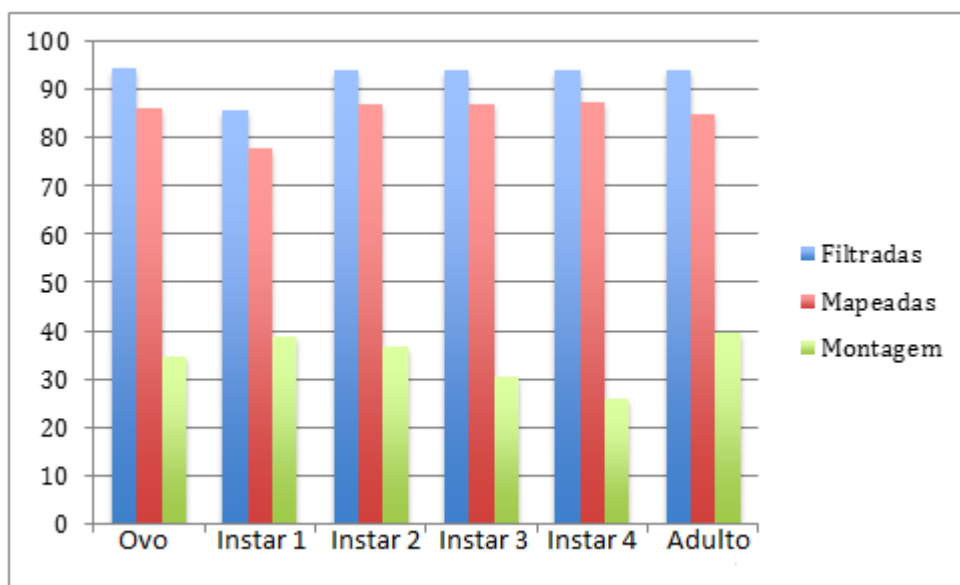


Figura 22 - Proporção de sequências de *Tuta absoluta* que foram filtradas (Filtradas) e posteriormente analisadas para redução de cobertura de sequenciamento para posterior montagem *de novo* (Montagem). A montagem do transcrito foi utilizada no alinhamento das bibliotecas sequenciadas (Mapeadas) para estudos envolvendo análise de expressão gênica

Após montagem do transcrito e a obtenção da lista de contigs, foi feita a análise de ontologia gênica com o *software* Blast2Go. Os resultados desta análise indicam que dos 93.477 contigs montados, 55.900 apresentaram similaridade (Blast *hits*) com alguma sequência disponível nas bases de dados consultadas durante o processo de anotação (Figura 23). Destes 55.900 contigs, 19.995 apresentaram alguma ontologia gênica (GO), e portanto

foram anotados. As análises mostraram ainda que insetos foram os organismos predominantes nas buscas por similaridade (Figura 24), com os insetos *Tribolium castaneum*, *Aedes aegypti* e *Nasonia vitripennis* apresentando maior similaridade com o transcrito gerado.

Estes resultados mostram que a montagem realizada, apesar de apresentar um elevado número de contigs, possui um sentido biológico pois além de apresentar muitos contigs similares com sequências descritas, os insetos são os organismos predominantes nestas semelhanças.

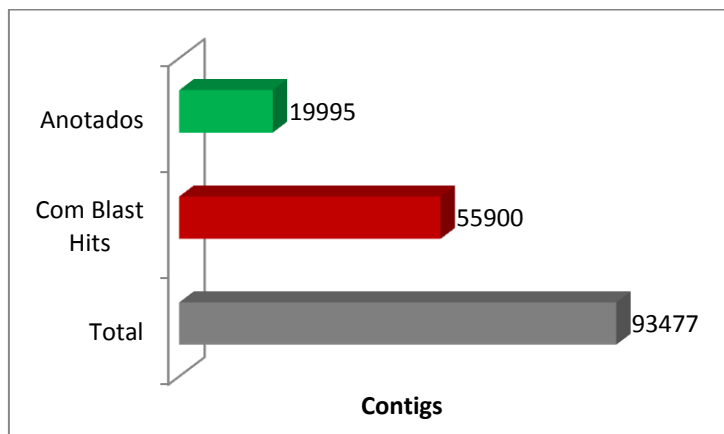


Figura 23 - Sumário do rendimento da anotação dos contigs totais de *Tuta absoluta* realizada no software Blast2Go

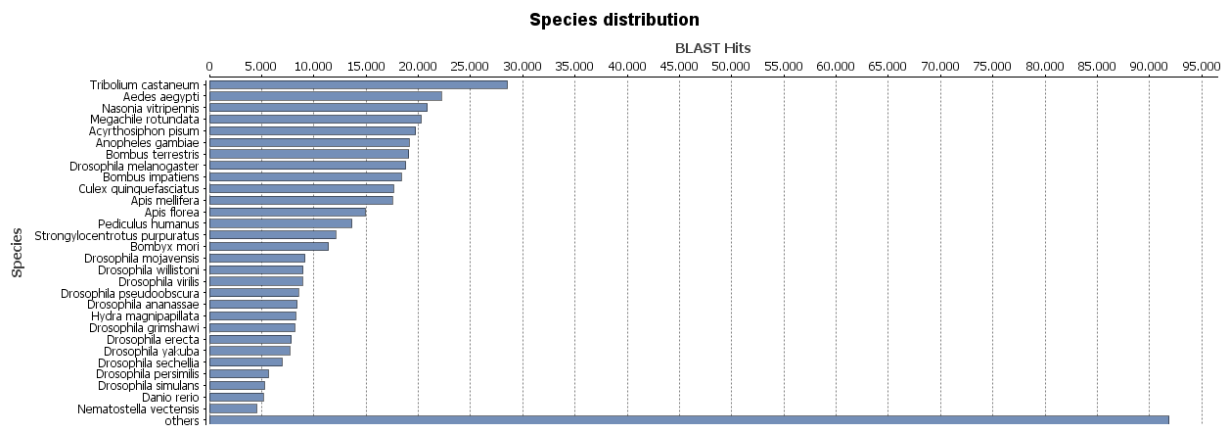


Figura 24 - Distribuição das espécies mais representadas na anotação dos contigs totais de *Tuta absoluta* realizada no software Blast2Go

4.8.2 Análise da expressão gênica diferencial entre as fases de desenvolvimento

Para a análise da expressão gênica, as sequências filtradas de *T. absoluta* foram alinhadas contra o transcrito de referência para avaliar a expressão diferencial. Do total de sequências filtradas, foi possível alinhar mais de 78% de cada biblioteca sequenciada (Mapeadas – Figura 22).

A análise da expressão gênica identificou um total de 3.633 genes diferencialmente expressos entre as diferentes fases de desenvolvimento, sendo 1310 entre o estágio de ovo e os estádios larvais, sendo 547 genes diferencialmente expressos entre ovo e o primeiro instar larval, 948 genes entre ovo e o segundo instar larval e 1.087 genes diferencialmente expressos entre ovo e o terceiro instar larval (Figura 25). Do mesmo modo, foram identificados 1011 genes diferencialmente expressos entre os diferentes estádios larvais e o estágio adulto. Quando comparados com o estágio adulto, foram encontrados 655 genes diferencialmente expressos no primeiro instar larval; 853 genes no segundo instar larval; e 654 genes diferencialmente expressos entre o terceiro instar larval e a fase adulta do inseto (Figura 25). Uma comparação entre a fase adulta e a fase de ovo revelou 1.212 genes diferencialmente expressos entre os dois estágios. Interessantemente, não foram encontradas diferenças significativas no nível de expressão gênica quando se compara os diferentes estádios larvais analisados, provavelmente por causa do nível de significância que depende dos parâmetros estatísticos utilizados. Nota-se ainda que existe diferença entre os números de genes diferencialmente expressos nas larvas em comparação tanto com ovo quanto com o adulto, evidenciando que existe diferença de expressão gênica entre os estádios larvais. Por exemplo, comparando-se com ovo, foram detectados 547 genes diferencialmente expressos no primeiro estágio larval e 948 diferencialmente expressos no segundo estágio larval, o que indica uma diferença de 401 genes entre os dois estádios larvais em relação ao ovo. Entretanto, esta diferença significativa com ovo e falta de significância entre os dois estádios larvais pode ser explicado pela janela de significância em que estes genes se encontram em ambas comparações. O valor numérico da expressão de um determinado gene nos diferentes estádios larvais pode não ser diferente o suficiente para ser considerado significativo entre os estádios. Entretanto, eles possuem diferenças que, apesar de não serem significativas, são grandes o suficiente para que somente em um ou alguns dos estádios sejam considerados significativamente diferente quando comparado com ovo ou adulto.

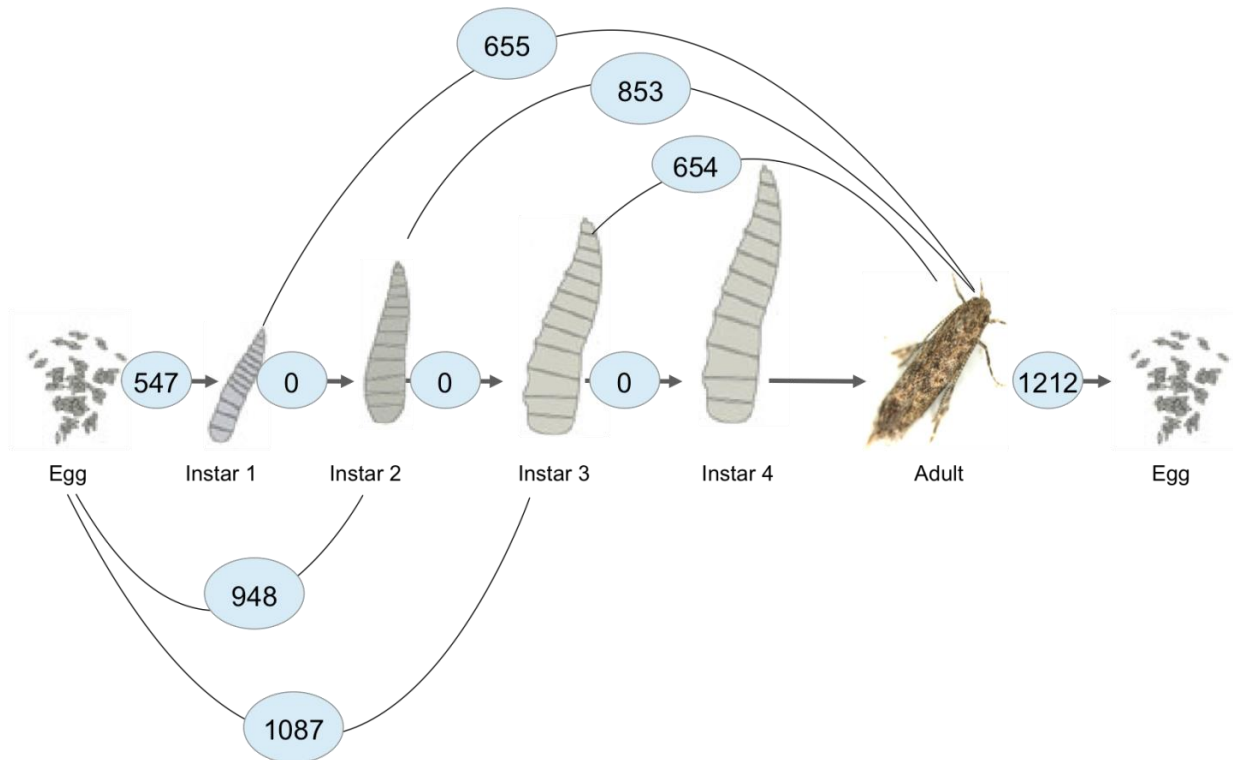


Figura 25 - Representação do número de genes diferencialmente expressos entre as diversas fases de desenvolvimento analisados (ovo; instar 1, 2, 3, 4 e adultos)

Estas observações sugerem que nos eventos mais significativos para o desenvolvimento deste inseto, que seriam a eclosão dos ovos e a emergência do adulto, é onde ocorre a maior alteração da expressão gênica neste organismo.

A disposição no diagrama de Venn agrupando genes diferencialmente expressos nestas fases permitiu a identificação dos genes diferencialmente expressos de cada uma das fases de desenvolvimento de *T. absoluta*, possibilitando a identificação daqueles que são exclusivos ou comuns entre as diversas combinações de fases analisadas (Figura 26). A primeira classificação realizada foi entre ovo e primeiro instar (L. STG1), segundo instar (L. STG2) e terceiro instar (L. STG3). Nesta classificação foram identificados 446 genes que são diferencialmente expressos entre ovo e todos os três instares larvais apresentados no diagrama (Figura 26A). Dos 547 transcritos diferencialmente expressos entre ovo e o primeiro instar larval, 52 genes são exclusivos desta comparação, 42 genes são também diferencialmente expressos entre ovo e o segundo instar larval e outros 7 são também diferencialmente expressos entre ovo e o terceiro instar larval. Dos 948 genes diferencialmente expressos entre ovo e o segundo instar larval, 131 são exclusivos desta comparação e 329 são também diferencialmente expressos entre ovo e o terceiro instar larval. Por fim, é possível observar no diagrama que 303 são exclusivamente expressos diferencialmente entre ovo e o terceiro s larval (Figura 26A).

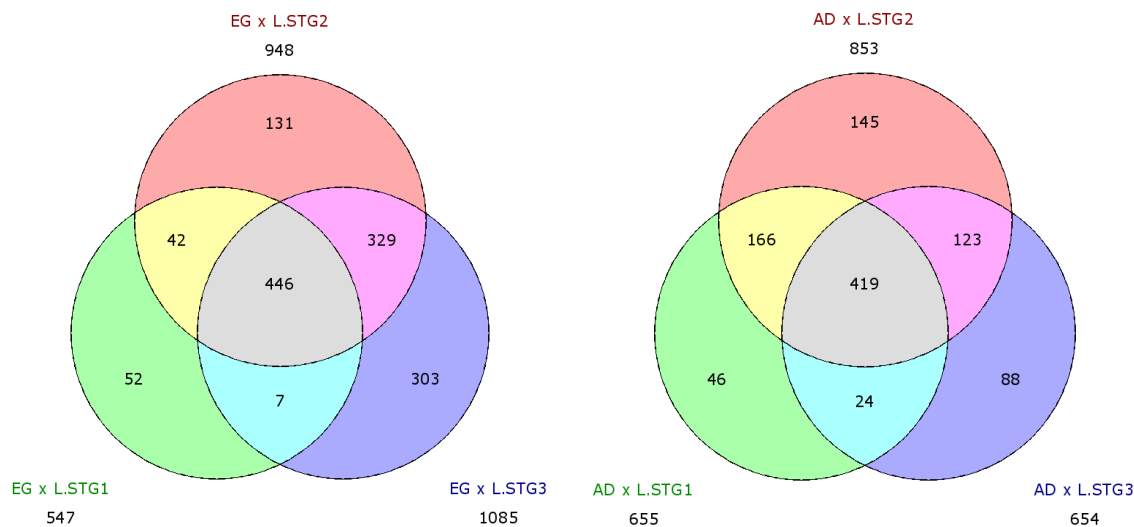


Figura 26 - Diagramas de Venn correlacionando genes diferencialmente expressos entre ovo (EG) e 3 estádios larvais: instar 1 (L. STG1), instar 2 (L. STG2) e instar 3 (L. STG3) (A), e o mesmo para adulto (AD) (B)

A segunda classificação realizada foi entre adulto (AD) e os três primeiros instares larvais. Nesta foram identificados 419 genes que são diferencialmente expressos entre adulto e todos os três instares larvais apresentados no diagrama (Figura 26B). Dos 655 transcritos diferencialmente expressos entre adulto e o primeiro instar larval, 46 genes são exclusivos desta comparação, 166 são também diferencialmente expressos entre adulto e o segundo instar larval e outros 24 são também diferencialmente expressos entre adulto e o terceiro instar larval. Dos 853 genes diferencialmente expressos entre adulto e o segundo instar larval, 145 são exclusivos desta comparação e 123 são também diferencialmente expressos entre adulto e o terceiro instar larval. Por fim, dos 654 genes diferencialmente expressos entre ovo e o terceiro estágio larval é possível observar no diagrama que 88 são exclusivos desta comparação (Figura 26B).

Nestas análises não foram incluídos os genes diferencialmente expressos entre o 4^o instar com ovo e também com adulto, devido há um problema com o arquivo que continha as sequências deste estágio de desenvolvimento, durante as análises de bioinformática.

4.8.3 Validação da expressão diferencial entre as fases de desenvolvimento (bibliotecas)

Foram selecionados 23 contigs (genes) diferencialmente expressos nos estádios larvais em relação ao ovo (20 genes) ou em relação ao adulto (3 genes) para validação da expressão diferencial entre as fases de desenvolvimento detectados nas bibliotecas de RNAseq, e para isso foram desenvolvidos iniciadores específicos para análise por RT-qPCR (Tabela 5). Esses genes foram analisados para expressão nas diversas fases de desenvolvimento de *T. absoluta*

em triplicata biológica, e os dados gerados pelo qPCR foram analisados no programa REST (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLÉ, 2002) utilizando três genes de referência: *Rpl5*, *Rpl23A* e *rRNA*. O programa REST, diferentemente do método “delta delta Ct” utilizado nas análises de RT-qPCR anteriores, permite a comparação entre grupos de amostra e a análises estatísticas, além da possibilidade de utilização de mais de um gene de referência (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLÉ, 2002). Os dados de expressão são apresentados em gráficos do tipo “Whisker-box plot”, onde a média dos valores observados entre as amostras normalizadas é representada por um traço na caixa (*box*), a caixa representa 50% dos valores observados e os outros 50% dos valores são divididos no quartil superior (25%) e inferior (25%) representados pelas barras de erros (*whiskers*). Esta representação dos dados permite a visualização da variação obtida entre as amostras pelo tamanho da caixa e pela extensão dos *whiskers*.

As análises revelaram que 22 dos 23 genes testados (95,6%) são diferencialmente expressos nos estádios larvais em relação ao ovo ou adulto (Figura 27), apenas um dos genes testados (12524, não mostrado) não apresentou este padrão de expressão diferencial. Entre os outros 22, alguns exemplos apresentaram valores de *fold change* em relação ao ovo ou adulto, iguais ou muito próximos aos obtidos com as análise do RNA-seq, como por exemplo nos contigs 2406, 12828, 21584, 23824, 36279, 58512, 77615 e 81147, outros apesar dos valores não serem próximos revelam uma tendência de expressão entre os estágios muito similares, como nos contigs 11301, 20172, 36206, 38086, 50455 e 75835. Para os demais apesar das diferenças de valores, ainda sim revelam claramente uma expressão diferencial nos estádios larvais. Esta discrepância nos valores pode ser explicada pela grande variação da expressão que ocorre entre as réplicas biológicas de uma mesma amostra ou por falsas estimativas geradas pelo tecnologia de sequenciamento massal.

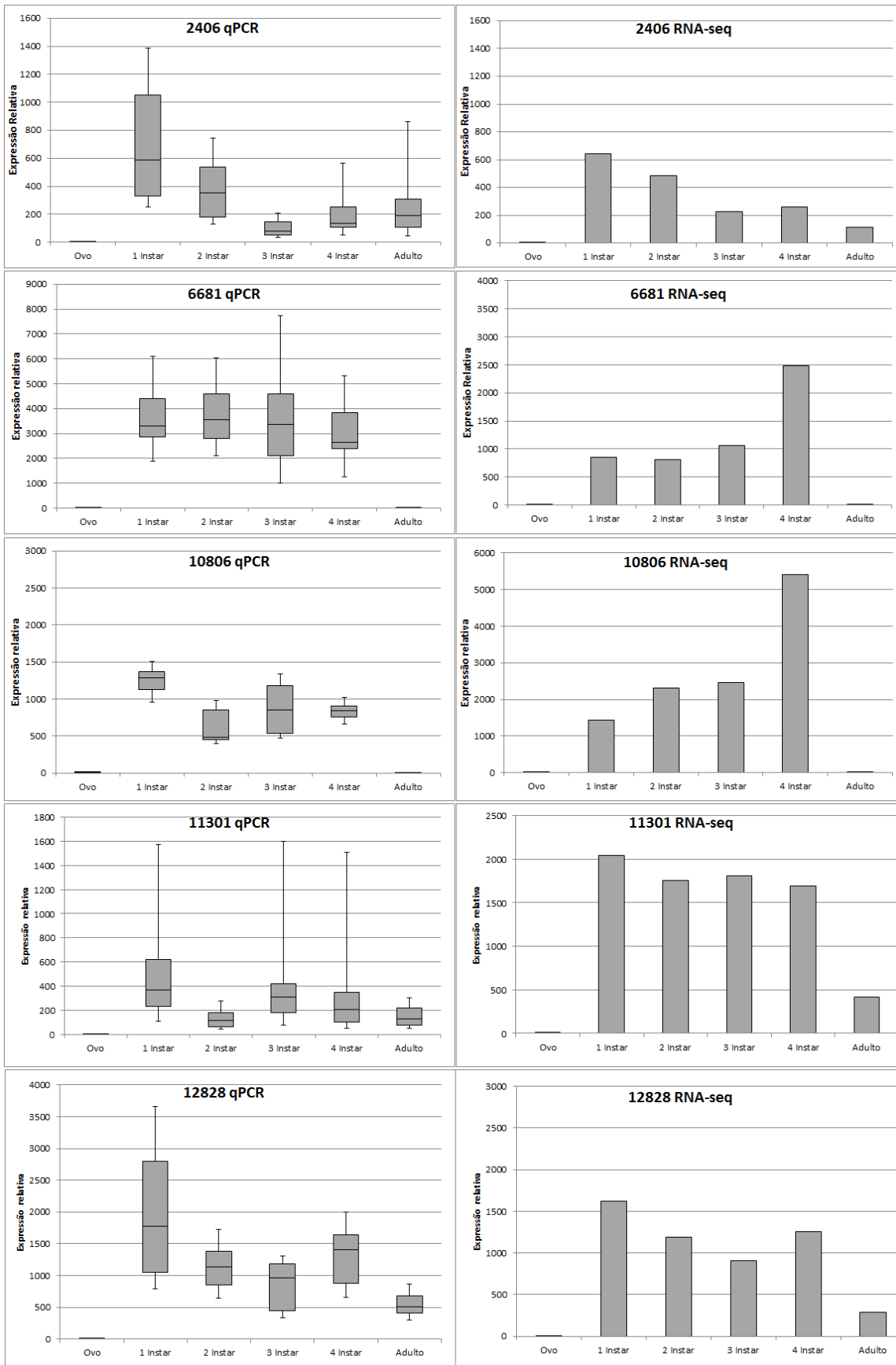


Figure 27a – Gráficos do tipo ‘whisker-box-plot’ (qPCR) e gráficos de barras (RNA-seq) da expressão relativa nas diferentes fases de desenvolvimento, dos genes diferentemente expressos 2406, 6681, 10806, 11301 e 12828

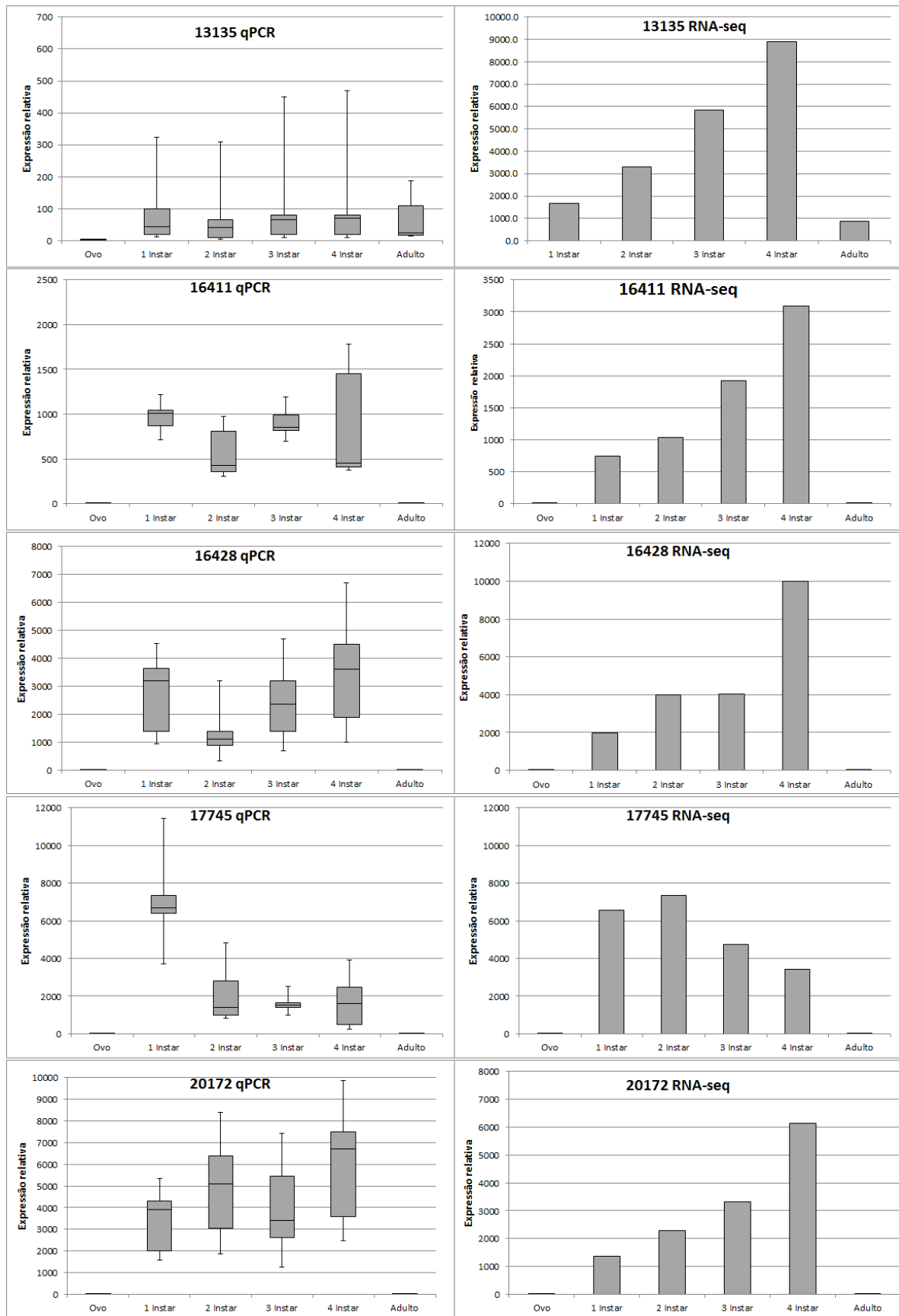


Figure 27b - Gráficos do tipo 'whisker-box-plot' (qPCR) e gráficos de barras (RNA-seq) da expressão relativa nas diferentes fases de desenvolvimento, dos genes diferentemente expressos 13135, 16411, 16428, 17745 e 20172

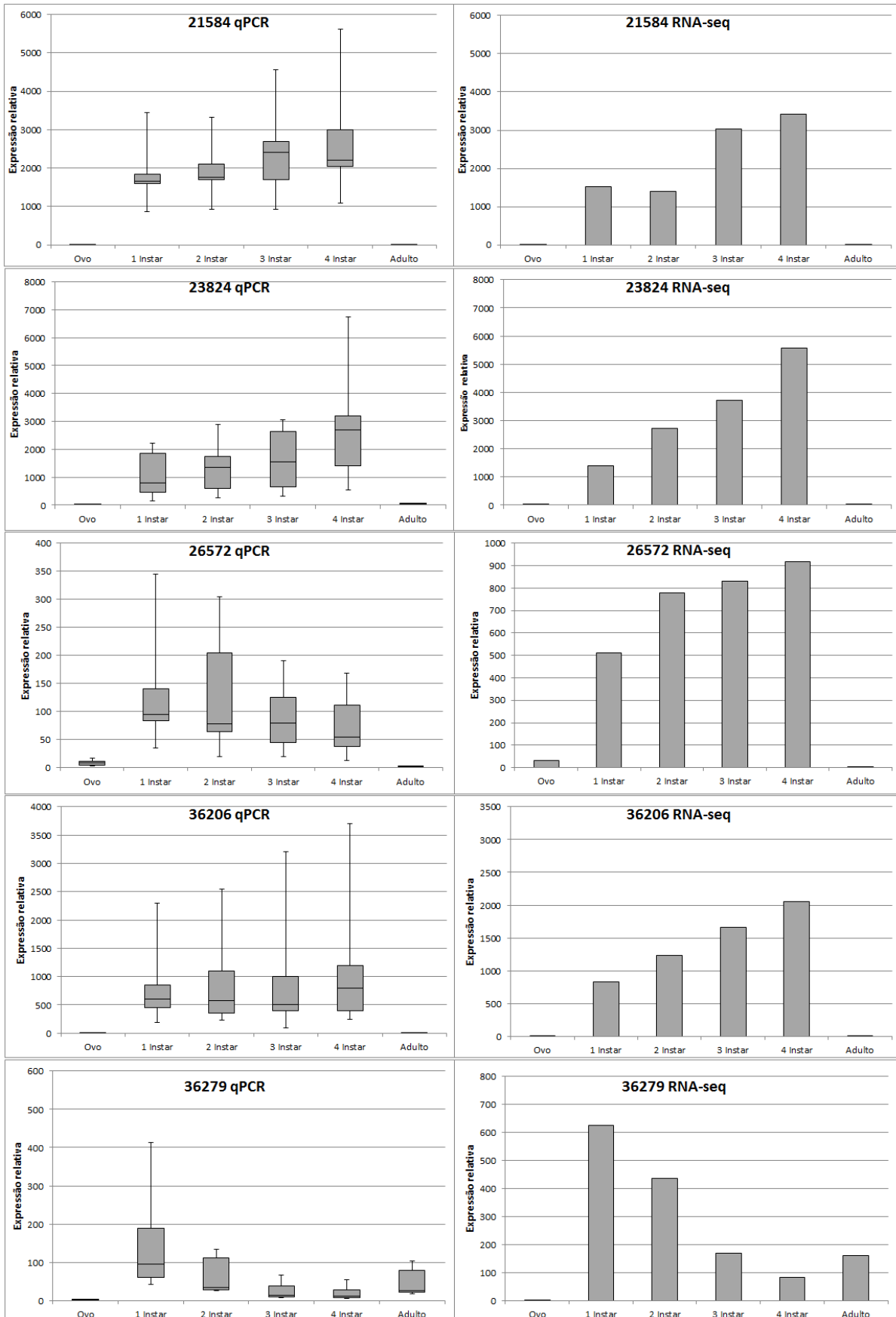


Figure 27c - Gráficos do tipo 'whisker-box-plot' (qPCR) e gráficos de barras (RNA-seq) da expressão relativa nas diferentes fases de desenvolvimento, dos genes diferentemente expressos 21584, 23824, 26572, 36206 e 36279

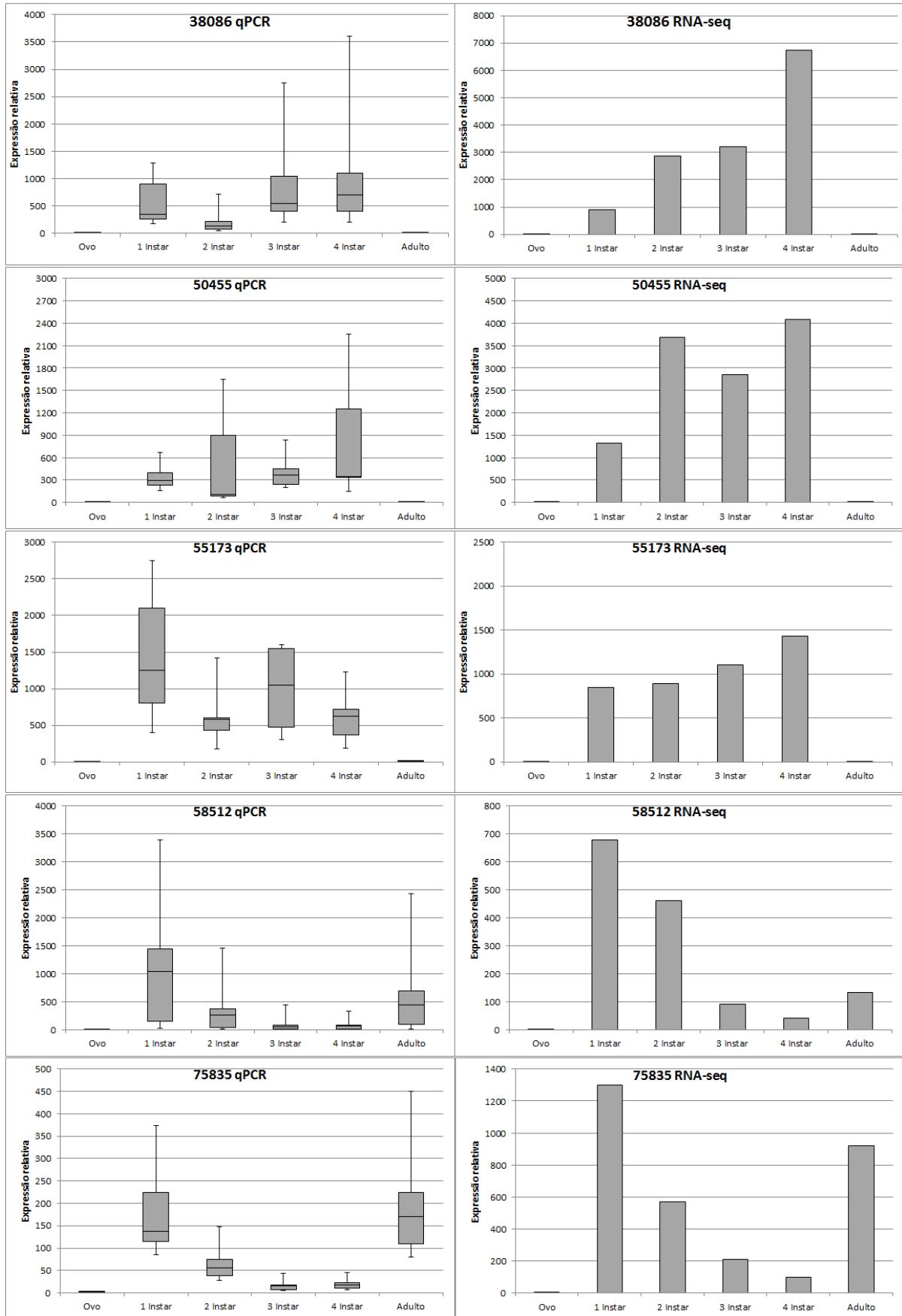


Figure 27d - Gráficos do tipo 'whisker-box-plot' (qPCR) e gráficos de barras (RNA-seq) da expressão relativa nas diferentes fases de desenvolvimento, dos genes diferencialmente expressos 38086, 50455, 55173, 58512 e 75835

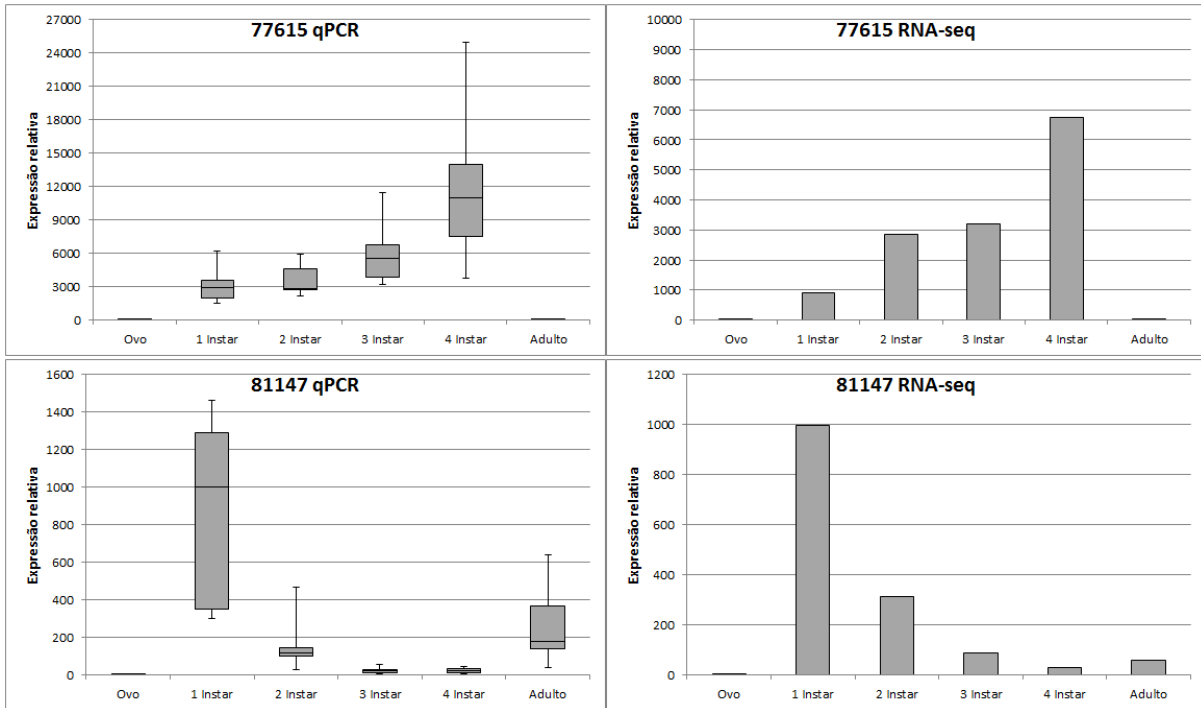


Figure 27e - Gráficos do tipo ‘whisker-box-plot’ (qPCR) e gráficos de barras (RNA-seq) da expressão relativa nas diferentes fases de desenvolvimento, dos genes diferencialmente expressos 77615 e 81147

De um modo geral esta análise permitiu avaliar a qualidade da análise de expressão diferencial observada, confirmando a robustez deste método de identificação, bem como da montagem do transcrito, validando as diferenças observadas entre as diversas fases de desenvolvimento por análise de bioinformática.

4.8.4 Agrupamento (*clustering*) das sequências das bibliotecas

O agrupamento das amostras foi realizado utilizando-se a expressão global, i.e., todos os transcritos expressos nas diversas fases de desenvolvimento. Este agrupamento revelou um gradiente de similaridade exatamente de acordo com a similaridade esperada entre as diferentes fases de desenvolvimento (Figura 28). A expressão gênica no ovo mostrou-se distinta de todas as outras fases de desenvolvimento. Entretanto, esta baixa similaridade é ainda menor entre ovo e adulto do que entre ovo e os estádios larvais. O mesmo efeito é observado para a expressão gênica no organismo adulto, sendo fracamente similar à expressão nos estádios larvais mais ainda menos similar quando comparada com a expressão gênica no ovo.

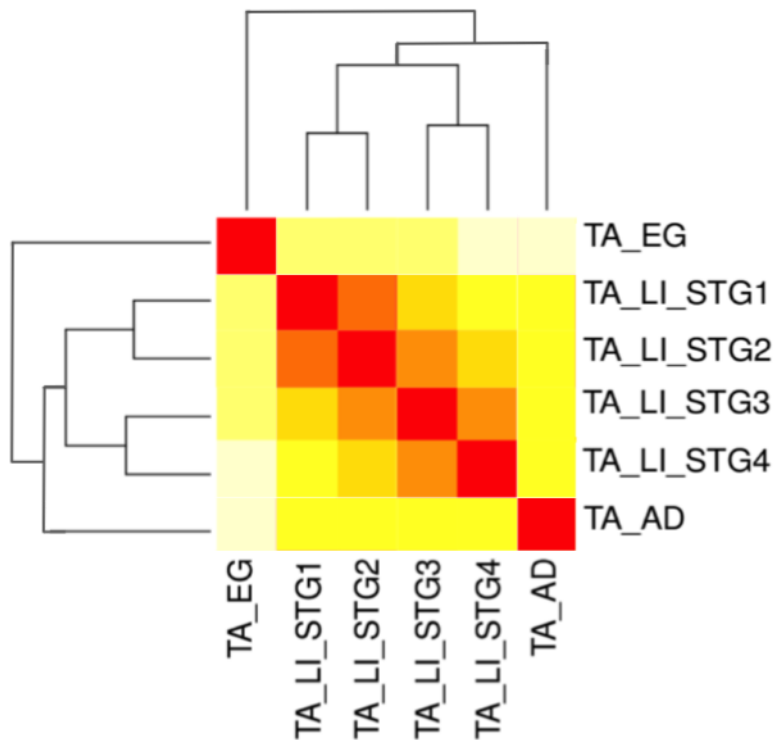


Figura 28 - *Heat Map* e agrupamento (*clustering*) indicando a correlação entre o transcrito geral das diversas fases de desenvolvimento, onde quanto mais intensa a cor (vermelho) maior a similaridade

Observando-se o padrão geral de similaridade durante o desenvolvimento, dois efeitos interessantes podem ser observados. Em primeiro lugar, a queda no grau de similaridade entre amostras aparenta ser mais drástica entre o estágio de ovo e as demais fases (linha superior do *Heatmap*). Por outro lado, apesar do grau de similaridade entre adulto e as demais fases ser baixo, a diferença entre adulto e os estádios larvais aparenta ser menor quando comparada à diferença entre ovo e estádios larvais (compare a tonalidade do amarelo na última linha com primeira linha do *Heatmap*). O segundo efeito que pode ser observado é o grau de similaridade entre os estágios de ovo e adulto com os estádios larvais mais distantes temporalmente ao longo do desenvolvimento. O baixo grau de similaridade entre ovo e os estádios larvais é ainda menor entre ovo e o último (quarto) estágio larval, ao passo que a baixa similaridade entre adulto e a larva parece ser constante nos quatro estádios larvais. Esta observação pode indicar que o padrão global de expressão gênica em *T. absoluta*, apesar de se modificar significativamente durante todo o ciclo de vida do inseto, aparenta ter a sua maior alteração durante a fase larval. Como o estágio de pupa não foi utilizado neste estudo, não se descarta a possibilidade desta alteração da expressão gênica ter o seu pico de dissimilaridade durante a fase de metamorfose do animal. Por fim, observando-se a comparação entre as fases larvais (centro do *Heatmap*), observa-se nitidamente um gradiente de similaridade que é máximo na comparação entre o mesmo estágio, e se reduz conforme a comparação é feita

com os estádios antecedentes ou sucedestes, observado pelo padrão de intensidade de cores em qualquer uma das quatro linhas centrais do *Heatmap*.

4.9 Novos genes alvos

4.9.1 Seleção dos novos genes alvos

Por meio das análises do transcrito da *Tuta absoluta* baseado na primeira montagem foram selecionados 11 novos genes para o silenciamento por RNAi (Tabela 6). O critério para escolha destes genes foi de acordo com o nível de expressão deles nos estádios larvais e homologia com outras espécies de insetos, levando em consideração a comparação com genes homólogos no banco de dados *Genbank* por meio da ferramenta Blastx. Por meio dos valores de RKPM determinados pelas análises de bioinformática na primeira montagem foram selecionados contigs altamente expressos nos primeiros estádios larvais, visando selecionar genes potencialmente essenciais para os estágios iniciais da herbivoria. Como a escolha dos genes-alvo é um ponto extremamente importante, as identidades destes novos contigs foi mantida em sigilo. Uma vez selecionados, iniciadores específicos para a amplificação destes contigs/genes foram desenhados de forma que os fragmentos fossem flanqueados pelas sequências de recombinação *attL1* e *attL2* (Tabela 6).

4.9.2 Clonagem

A amplificação dos novos genes candidatos foi realizada a partir de amostras de RNA total derivadas dos quatro estádios larvais mais o estágio de pupa de *T. absoluta*. Os fragmentos amplificados (Figura 29) foram então recortados e purificados do gel e inseridos em vetor pGEM-T Easy. A obtenção do DNA plasmidial contendo os fragmentos de interesse foi realizada através da clonagem do vetor em bactérias e pelo isolamento de colônias (8 por amostra), seguido de crescimento em meio líquido e extração dos plasmídeos recombinantes por lise alcalina. A confirmação da presença dos insertos foi feita a partir da digestão dos plasmídeos com *EcoRI*.

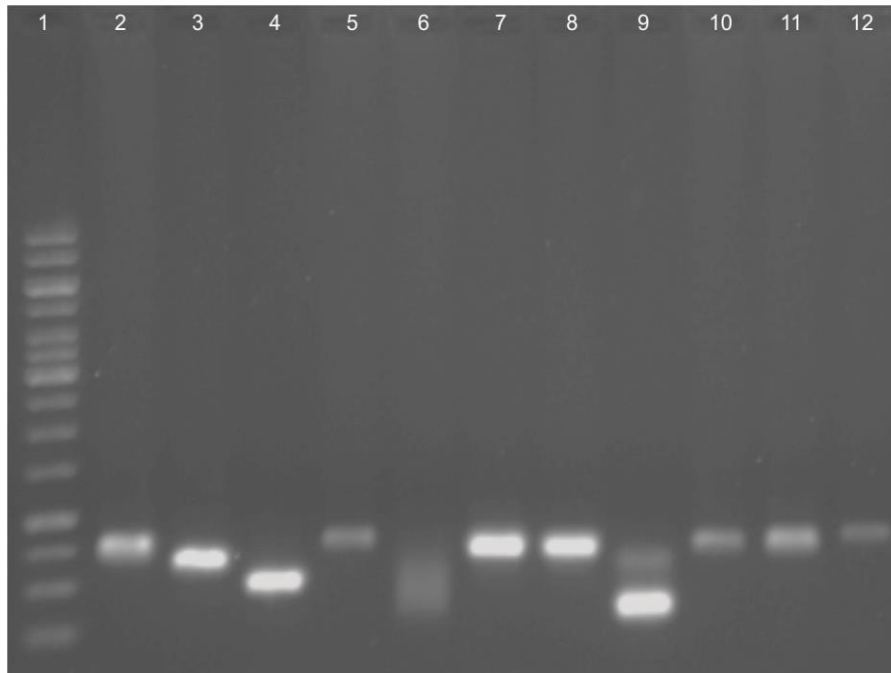


Figura 29 - Gel de 1% agarose com os produtos de amplificação dos fragmentos gênicos dos 11 contigs selecionados contendo as bordas de recombinação *attL1* e *attL2*. As bandas referentes aos contigs 9589 de 524 pb (2), 4623 de 472 pb (3), 4303 de 422 pb (4), 1360 de 554 pb (5), 592 de 530 pb (7), 77 de 495 pb (8), 2308 de 309 pb (9), 2779 de 523 pb (10), 2594 de 521 pb (11) e 2132 de 556 pb (12) foram recortadas e purificadas do gel. Ladder 1 kb (1) também é mostrado

Dos 11 genes selecionados, até o momento foi possível amplificar com sucesso dez, dos quais 5 foram clonados em pGEM-T easy. Estes cinco novos genes clonados foram utilizados em ensaios de alimentação para o fornecimento de dsRNA para lagartas de *T. absoluta* por absorção.

4.9.3 Síntese de dsRNA *in vitro*

Foram sintetizados *in vitro* os dsRNA dos 5 novos genes alvos (com cerca de 400 pb), dos 3 genes previamente clonados (ATPase, AK e EcR) e o gene controle GFP para serem usados nos ensaios de alimentação. A qualidade dos dsRNAs foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose desnaturante (não mostrada).

4.9.4 Ensaio de alimentação

Este ensaio de alimentação teve como objetivo avaliar o efeito do dsRNA dos novos genes alvo sobre as lagartas e compará-los aos 3 genes anteriores. Este ensaio foi realizado em triplicata biológica e para a avaliação do efeito foi realizada a pesagem das lagartas (N=30) após 5 dias de alimentação nos folíolos que absorveram o dsRNA dos respectivos

fragmentos gênicos. O RNA total destas amostras de larvas também foram extraídos e submetidos a análise quantitativa de transcritos reversos (Figura 30).

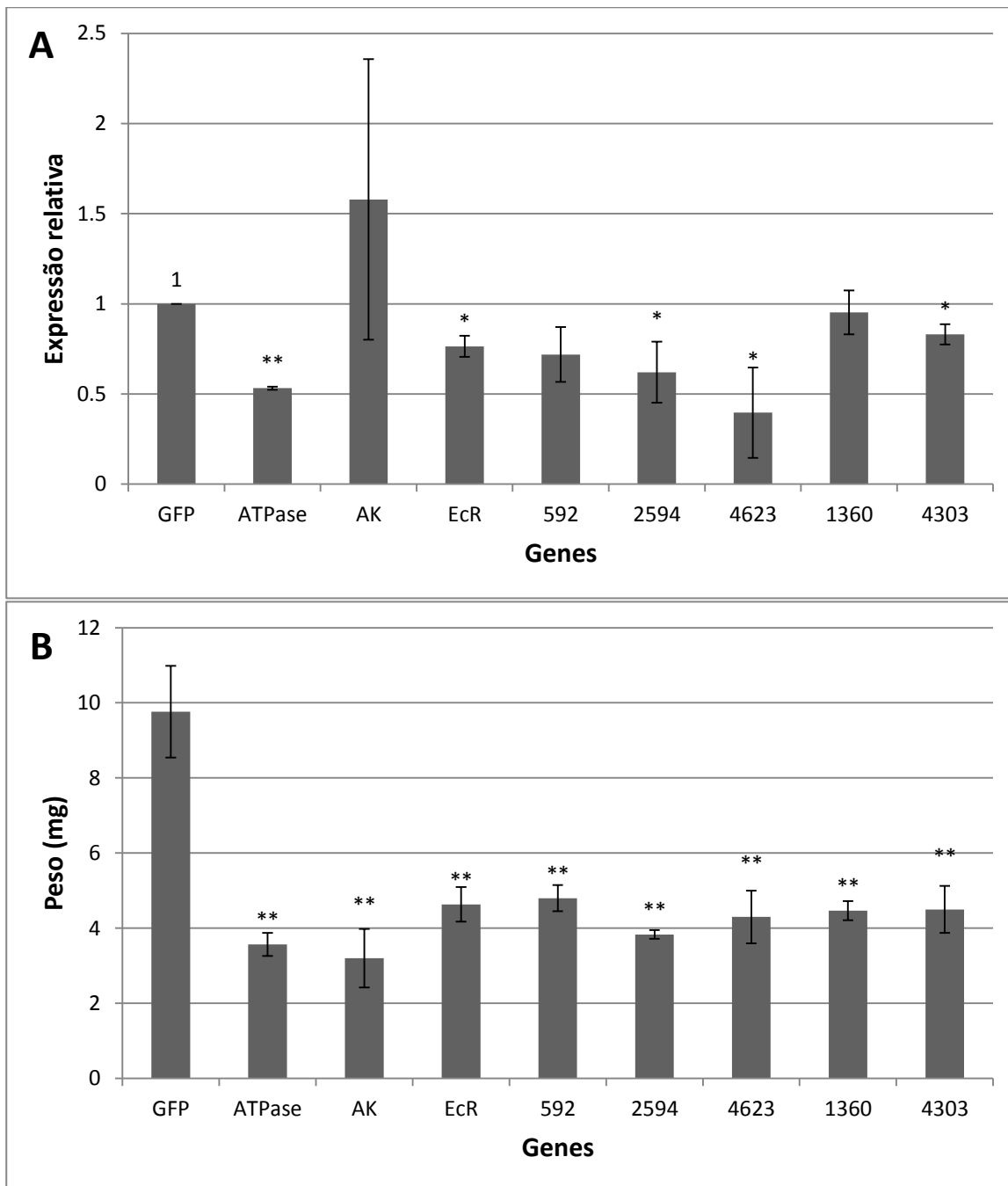


Figura 30 – Gráficos da expressão relativa (A) e do peso das lagartas (B) após 5 dias de tratamento dos respectivos genes-alvo utilizados nos ensaios de alimentação em relação ao gene controle GFP. Estão representados os valores médios com as barras de erro mostrando o desvio padrão entre as amostras, médias seguidas de * ou ** diferem a $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente no teste *T student* (N=3). Amostras foram normalizadas com o gene *Rpl5*

Por este ensaio, pode-se observar um expressivo retardo de crescimento das lagartas, evidenciado pelo menor peso total das lagartas em relação ao grupo controle (GFP) em todos os genes-alvo testados de uma maneira muito similar, variação de 30% a 50% do peso do

grupo controle. Apesar deste significativo efeito observado em todos os tratamentos, nem todos os candidatos apresentaram um silenciamento gênico específico que seria esperado como causa deste efeito, exemplo os genes AK, 592 e 1360. Mais intrigante o caso do gene AK, que foi o candidato em que as lagartas apresentaram a menor média de peso e em contraste teve a maior média de expressão (cerca de 150% em relação ao controle), com uma oscilação muito acentuada. Um dos motivos que poderia explicar este fato seria a super expressão do gene AK, como uma resposta de algumas lagartas ao silenciamento gênico que provavelmente ocorreu nos primeiros dias de tratamento culminando com o retardo do crescimento observado.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através dos ensaios preliminares de herbivoria com plantas transgênicas, e nos ensaios de alimentação tanto com dsRNA sintetizado *in vitro* como com infiltração com agrobactéria transformada, sugerem que a técnica de RNAi através da ingestão de moléculas de dsRNA e/ou siRNA é funcional em *Tuta absoluta* e portanto pode ser usada como método de controle desta praga.

As metodologias para fornecimento das moléculas de RNAi, desenvolvidas durante este trabalho e utilizadas nos ensaios de alimentação, se mostraram satisfatórias em reduzir a quantidade de transcritos dos genes alvos correspondentes, sendo uma alternativa rápida e fácil para se testar e eficácia de diversos possíveis genes alvos de silenciamento e as consequências para o inseto.

A absorção de solução de dsRNA pela folha através do pecíolo supre a necessidade de se desenvolver dietas artificiais para este tipo de ensaio com este inseto, que apresenta limitações à criação em dieta artificial.

A técnica de agroinfiltração se mostrou uma valiosa ferramenta para se testar construções de silenciamento (cassetes inseridos em vetores de transformação), como por exemplo com diferentes genes e diferentes tamanhos de fragmentos do mesmo gene, em um ensaio relativamente simples e eficiente, antes de se investir em um longo e laborioso experimento de transformação genética de planta.

Cabe ainda ressaltar que os ensaios foram conduzidos somente com as folhas das plantas transgênicas T₀, portanto são necessários ensaios com plantas homozigotas T₂, com diversas plantas inteiras para cada construção, para provar que o RNAi é capaz de controlar a *Tuta absoluta* em testes “de campo”.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M.D.; CELNIKER, S.E.; HOLT, R.A.; EVANS, C.A.; GOCAYNE, J.D.; AMANATIDES, P.G.; SCHERER, S.E.; LI, P.W.; HOSKINS, R.A.; GALLE, R.F.; GEORGE, R.A.; LEWIS, S.E.; RICHARDS, S.; ASHBURNER, M.; HENDERSON, S.N.; SUTTON, G.G.; WORTMAN, J.R.; YANDELL, M.D.; ZHANG, Q.; CHEN, L.X.; BRANDON, R.C.; ROGERS, Y.H.; BLAZEJ, R.G.; CHAMPE, M.; PFEIFFER, B.D.; WAN, K.H.; DOYLE, C.; BAXTER, E.G.; HELT, G.; NELSON, C.R.; GABOR, G.L.; ABRIL, J.F.; AGBAYANI, A.; AN, H.J.; ANDREWS-PFANNKOCH, C.; BALDWIN, D.; BALLEW, R.M.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BAYRAKTAROGLU, L.; BEASLEY, E.M.; BEESON, K.Y.; BENOS, P.V.; BERMAN, B.P.; BHANDARI, D.; BOLSHAKOV, S.; BORKOVA, D.; BOTCHAN, M.R.; BOUCK, J.; BROKSTEIN, P.; BROTTIER, P.; BURTIS, K.C.; BUSAM, D.A.; BUTLER, H.; CADIEU, E.; CENTER, A.; CHANDRA, I.; CHERRY, J.M.; CAWLEY, S.; DAHLKE, C.; DAVENPORT, L.B.; DAVIES, P.; DE PABLOS, B.; DELCHER, A.; DENG, Z.; MAYS, A.D.; DEW, I.; DIETZ, S.M.; DODSON, K.; DOUP, L.E.; DOWNES, M.; DUGAN-ROCHA, S.; DUNKOV, B.C.; DUNN, P.; DURBIN, K.J.; EVANGELISTA, C.C.; FERRAZ, C.; FERRIERA, S.; FLEISCHMANN, W.; FOSLER, C.; GABRIELIAN, A.E.; GARG, N.S.; GELBART, W.M.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GONG, F.; GORRELL, J.H.; GU, Z.; GUAN, P.; HARRIS, M.; HARRIS, N.L.; HARVEY, D.; HEIMAN, T.J.; HERNANDEZ, J.R.; HOUCK, J.; HOSTIN, D.; HOUSTON, K.A.; HOWLAND, T.J.; WEI, M.H.; IBEGWAM, C.; JALALI, M.; KALUSH, F.; KARPEN, G.H.; KE, Z.; KENNISON, J.A.; KETCHUM, K.A.; KIMMEL, B.E.; KODIRA, C.D.; KRAFT, C.; KRAVITZ, S.; KULP, D.; LAI, Z.; LASKO, P.; LEI, Y.; LEVITSKY, A.A.; LI, J.; LI, Z.; LIANG, Y.; LIN, X.; LIU, X.; MATTEI, B.; MCINTOSH, T.C.; MCLEOD, M.P.; MCPHERSON, D.; MERKULOV, G.; MILSHINA, N.V.; MOBARRY, C.; MORRIS, J.; MOSHREFI, A.; MOUNT, S.M.; MOY, M.; MURPHY, B.; MURPHY, L.; MUZNY, D.M.; NELSON, D.L.; NELSON, D.R.; NELSON, K.A.; NIXON, K.; NUSSKERN, D.R.; PACLEB, J.M.; PALAZZOLO, M.; PITTMAN, G.S.; PAN, S.; POLLARD, J.; PURI, V.; REESE, M.G.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; SAUNDERS, R.D.; SCHEELER, F.; SHEN, H.; SHUE, B.C.; SIDÉN-KIAMOS, I.; SIMPSON, M.; SKUPSKI, M.P.; SMITH, T.; SPIER, E.; SPRADLING, A.C.; STAPLETON, M.; STRONG, R.; SUN, E.; SVIRSKAS, R.; TECTOR, C.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, A.H.; WANG, X.; WANG, Z.Y.; WASSARMAN, D.A.; WEINSTOCK, G.M.; WEISSENBACH, J.; WILLIAMS, S.M.; WOODAGET- WORLEY, K.C.; WU, D.; YANG, S.; YAO, Q.A.; YE, J.; YEH, R.F.; ZAVERI, J.S.; ZHAN, M.; ZHANG, G.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHENG, X.H.; ZHONG, F.N.; ZHONG, W.; ZHOU, X.; ZHU, S.; ZHU, X.; SMITH, H.O.; GIBBS, R.A.; MYERS, E.W.; RUBIN, G.M.; VENTER, J.C. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, Washington, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, Mar. 2000.

ARAVIN, A.A.; NAUMOVA, N.M.; TULIN, A.V.; VAGIN, V.V.; ROZOVSKY, Y.M.; GVOZDEV, V.A. Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. **Current Biology**, Cambridge, v. 11, n. 13, p. 1017–1027, July 2001.

BALTIMORE, D.; BECKER, Y.; DARNELL, J.E. Virus specific double-stranded RNA in poliovirus infected cells. **Science**, Washington, v. 143, n. 3610, p. 1034-1036, Mar. 1964.

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

BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. **Nature**, London, v. 431, p. 356-363, Sept. 2004.

BAUM, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, n. 11, p. 1322-1326, Nov. 2007.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society of London**, London, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.

BISHOP, G.J.; NOMURA, T.; YOKOTA, T.; HARRISON, K.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; JONES, J.D.G.; KAMIYA, Y. The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 4, p. 1761-1766, Feb. 1999.

BOUTROS, M.; AHRINGER, J. The art and design of genetic screens: RNA interference. **Nature Reviews: Genetics**, London, v. 9, n. 7, p. 554–566, July 2008.

BRAGG, J.; RAJKOVIC, A.; ANDERSON, C.; CURTIS, R.; VAN HOUTEN, J.; BEGRES, B.; NAPLES, C.; SNIDER, M.; FRAGA, D.; SINGER, M. Identification and Characterization of a Putative Arginine Kinase Homolog from *Myxococcus xanthus* Required for Fruiting Body Formation and Cell Differentiation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 224, n. 10, p. 2668-2676, May 2012.

CAMPOS, M.L.; ALMEIDA, M. de; ROSSI, M.L.; MARTINELLI, A.P.; LITHOLDO JÚNIOR, C.G.; FIGUEIRA, A.; RAMPELOTTI-FERREIRA, F.T.; VENDRAMIM, J.D.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 15, p. 4347–4361, Sept. 2009.

CAMPOS, M.L.; CARVALHO, R.F.; BENEDITO V.A.; PERES, L.E.P. Small and remarkable the Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 5, n. 3, p. 267-270, Mar. 2007.

CARMELL, M.A.; XUAN, Z.; ZHANG, M.Q.; HANNON, G.J. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Genes and Development**, Woodbury, v. 16, n. 21, p. 2733-2742, Nov. 2002.

CARTHEW, R.W.; SONTHEIMER, E.J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, Cambridge, v.136, n. 4, p. 642–655, Feb. 2009.

CARVALHO, F. de; GHEYSEN, G.; KUSHNIR, S.; MONTAGU, M. van, CASTRESANA, C. Suppression of beta-1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. **The Embo Journal**, Oxford, v. 11, n. 7, p. 2595–2602, July 1992.

CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F.H.; MEDEIROS, M.A.; LEAL, J.G.T. Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-dascrucíferas: um estudo de caso. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 60-63, Mar. 2001.

CASTELO BRANCO, M.; PONTES, L.A.; AMARAL, P.S.T.; MESQUITA FILHO, M.V. Inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e broca-grande e seu impacto sobre *Trichogramma pretiosum*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 652-654, Dec. 2003.

CHEN, J.; ZHANG, D.; YAO, Q.; ZHANG, J.; DONG, X.; TIAN, H.; ZHANG, W. Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Insect Molecular Biology**, Chichester, v. 19, n. 6, p. 777-786, Aug. 2010.

CHEN, X.; TIAN, H.; ZOU, L.; TANG, B.; HU, J.; ZHANG, W. Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 98, n. 6, p. 613-619, July 2008.

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALON, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, Aug. 2005.

DELPUECH, J.M.; GAREAU, E.; FROMENT, B.; ALLEMAND, R.; BOULETREAU, M. Effets de différentes doses d'un insecticide sur la communication par phéromones sexuelles du trichogramme, *Trichogramma brassicae* Bezdenko (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Annales de la Société Entomologique de France**, Abingdon, v. 35, p. 514-516, July 1999.

DESNEUX, N.; WAJNBERG, E.; WYCKHUYS, K.A.G.; BURGIO, G.; ARPAIA, S.; NARVAEZ-VASQUEZ, C.A.; GONZALEZ-CABRERA, J.; RUESCAS, D.C.; TABONE, E.; FRANDON, J.; PIZZOL, J.; PONCET, C.; CABELLO, T.; URBANEJA, A. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 83, p. 197-215, July 2010.

DUDLEY, N.R.; LABBE, J.C.; GOLDSTEIN, B. Using RNA interference to identify genes required for RNA interference. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 7, p. 4191-4196, Apr. 2002.

FAGARD, M.; BOUTET, S.; MOREL, J.B.; BELLINI, C.; VAUCHERET, H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 21, p. 11650-11654 Oct. 2000.

FAO. **FAOSTAT**: agriculture data. Disponível em <<http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em: 10 out. 2013.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. 412 p.

FIRE, A.; XU, S.Q.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v. 391, n. 6669, p. 806-811, Feb. 1998.

FRANÇA, F.H.; VILLAS BOAS, G. L.; CASTELO BRANCO, M.; MEDEIROS, M.A. Manejo integrado de pragas. In: SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B. (Org.). **Tomate para processamento industrial**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 2000. p. 112-127.

GENBANK. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 13 out. 2013.

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

GILBERT, W. Origin of life: the RNA world. **Nature**, London, v. 319, p. 618, Feb. 1986.

GOLDEN, D.E.; GERBASI, V.E.; SONTHEIMER, E.J. An inside job for siRNAs. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 31, p. 309-312, Ago. 2008.

GORDON, K.H.J.; WATERHOUSE, P.M. RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, n. 11, p. 1231-1232, Nov. 2007.

GRABHERR, M.G.; HASS, B.J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J.Z.; THOMPSON, D.A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; PALMA, F.D.; BIRREN, B.W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, New York, v. 29, p. 644-652, Apr. 2011.

GRATAO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ANTUNES, A.M.; PERES, L.E.P.; AZEVEDO, R.A. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. **Annals of Applied Biology**, Chichester, v. 153, n. 3, p. 321-333, Nov. 2008.

GRISHOK, A.; TABARA, H.; MELLO, C.C. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. **Science**, Washington, v. 287, n. 31, p. 2494-2497, Mar. 2000.

GUPTA, V.; MATHUR, S.; SOLANKE, A.U.; SHARMA, M.K.; KUMAR, R.; VYAS, S.; KHURANA, P.; KHURANA, J.P.; TYAGI, A.K.; SHARMA, A.K. Genome analysis and genetic enhancement of tomato. **Critical Reviews in Biotechnology**, New York, v. 29, n.2, p. 152-181, Sept. 2009.

HAMMOND, S.M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D.; HANNON, G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **Nature**, London, v. 404, n. 6775, p. 293-296, Mar. 2000.

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

HASE, S.; TAKAHASHI, S.; TAKENAKA, S.; NAKAHO, K.; ARIE, T.; SEO, S.; OHASHI, Y.; TAKAHASHI, H. Involvement of jasmonic acid signaling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. **Plant Pathology**, Chichester, v. 57, n. 5, p. 870-876, Oct. 2008.

HASS, B.J.; ZODY, M.C. Advancing RNA-seq analysis. **Nature Biotechnology**, New York, v. 28, n. 5, p. 421-423, May 2010.

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

IJIMA, Y.; NAKAMURA, Y.; OGATA, Y.; TANAKA, K.; SAKURAI, N.; SUDA, K.; SUZUKI, T.; SUZUKI, H.; OKAZAKI, K.; KITAYAMA, M.; KANAYA, S.; AOKI, K.; SHIBATA, D. Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, n. 5, p. 949-962, June 2008.

JANSSEN, C.; SMITH, S.; FOSTER, R.; LATIN, R.; WELLER, S.; WHITFORD, F. **Pest control in tomatoes for processing**. West Lafayette: Purdue University, Purdue Pesticides Programs, Cooperative Extension Service, 1999. 19 p.

JONES, L.; RATCLIFF, F.; BAULCOMBE, D. C. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. **Current Biology**, Cambridge, v. 11, n. 10, p. 747-757, May 2001.

KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER A. Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 193-195, May 2002.

KIGER, A.A.; BAUM, B.; JONES, S.; JONES, M.R.; COULSON, A.; ECHEVERRI, C.; PERRIMON, N. A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference. **Journal of Biology**, London, v. 2, n. 4, p. 1-15, Oct. 2003.

KOELLE, M.R.; TALBOT, W.S.; SEGRAVES, W.A.; BENDER, M.T.; CHERBAS, P.; HOGNESS, D.S. The *Drosophila EcR* gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. **Cell**, Cambridge, v. 67, p. 59-77, Oct. 1991.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. **Nucleic Acids Research**, London, v. 39, n. 1, p. 152-157, Jan. 2011.

KROL, A. van der; MUR, L.; BELD, M.; MOL, J.; STUITJE, A. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 2, n. 4, p. 291-299, Apr. 1990.

LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M.; SALZBERG, S.L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, London, v. 10, n. 3, Mar. 2009. Disponível em: <<http://genomebiology.com/2009/10/3/r25>>. Acesso em: 14 out. 2012.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, Sept. 2007.

LI, T.R.; BENDER, M. A conditional rescue system reveals essential functions for the ecdysone receptor (*EcR*) gene during molting and metamorphosis in *Drosophila*. **Development**, Cambridge, v. 127, n. 13, p. 2897-2905, July 2000

LI, X.X.; ZHANG, M.Y.; ZHANG, H.Y. RNA Interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 3, Mar. 2011. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0017788>>. Acesso em: 12 mar. 2013.

LIETTI, M.M.M.; BOTTO, E.; ALZOGARAY, R.A. Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, London, v. 34, n. 1, p. 113-119, Feb. 2005.

LIPPMAN, Z.; MARTIENSSEN, R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, London, v. 431, n. 7006, p. 364–370, Sept. 2004.

LIU, Q.; RAND, T.A.; KALIDAS, S.; DU, F.; KIM, H.E.; SMITH, D.P.; WANG, X. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. **Science**, Washington, v. 301, n.5641, p. 1921–1925, Sept. 2003.

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

MALUF, W.R.; SILVA, V.F.; CARDOSO, M.G.; GOMES, L.A.A.; GONÇALVES NETO, A.C.; MACIEL, G.M.; NÍZIO, D.A.C. Resistance to the South American tomato pinworm *Tuta absoluta* in high acylsugar and/or high zingiberene tomato genotypes. **Euphytica**, Dordrecht, v. 176, p. 113-123, Aug. 2010

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

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

MARQUES-SOUZA, H.; ARANDA, M.; BAYER, T.; TAUTZ, D. The role of the segmentation gene hairy in *Tribolium*. **Development, Genes and Evolution**, Heidelberg, v. 218, p. 465-477, Aug. 2008.

MARTINEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; URLAUB, H.; LUHRMANN, R.; TUSCHL, T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. **Cell**, Cambridge, v. 110, n. 5, p. 563–574, Sept. 2002.

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

MELLO, C.C.; CONTE JUNIOR, D. Revealing the world of RNA interference. **Nature**, London, v. 431, n. 7006, p. 338-342, Sept. 2004.

- METTE, M.F.; AUFSATZ, W.; VAN DER WINDEN, J.; MATZKE, M.A.; MATZKE, A.J. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. **The Embo Journal**, Oxford, v. 19, n. 19, p. 5194–5201, Oct. 2000.
- MONTAGNIER, L.; SANDERS, P.K. Replicative form of encephalomyocarditis virus RNA. **Nature**, London, v. 199, n. 4894, p. 664–667, Aug. 1963.
- MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B.A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq. **Nature Methods**, New York, v. 5, n. 7, p. 621–628, July 2007.
- NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **Plant Cell**, Rockville, v. 2, n. 4, p. 279–289, Apr. 1990.
- NELSON, N.; PERZOV, N.; COHEN, A.; HAGAI, K.; PADLER, V.; NELSON, H. The Cellular Biology of Proton-Motive Force Generation by V-ATPases. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 203, p. 89–95, Jan. 2000.
- OHNISHI, A.; HULL, J.J.; MATSUMOTO, S. Targeted disruption of genes in the *Bombyx mori* sex pheromone biosynthetic pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 12, p. 4398–4403, Mar. 2006.
- OLIVEROS, J.C. VENNY: **An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams**. Disponível em: <<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>>. Acesso em: 10 jan. 2013.
- PAL-BHADRA, M.; BHADRA, U.; BIRCHLER, J. A. RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. **Molecular Cell**, Cambridge, v.9, n. 2, p. 315–327, Feb. 2002.
- PATEL, R.K.; JAIN, M. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 2, Feb. 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0030619>>. Acesso em: 27 mar. 2013.
- PERRIMON, N.; NI, J.Q.; PERKINS, L. In vivo RNAi: today and tomorrow. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, v. 2, n. 8, p. 1–11, June 2010.
- PICANÇO, M.; LEITE, G.L.D.; GUEDES, R.N.C.; SILVA, E.A. Yield loss in trellised tomato affected by insecticidal sprays and plant spacing. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 17, n. 5, p. 447–452, July 1998.
- PINO, L.E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M.S.; SCOTTON, D.C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. **Plant Methods**, London, v. 6, n. 23, p. 1–11, Oct. 2010.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, May 2001.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 30, n. 9, p. 1-10, May 2002.

PNUELI, L.; CARMEL-GOREN, L.; HAREVEN, D.; GUTFINGER, T.; ALVAREZ, J.; GANAL, M.; ZAMIR, D.; LIFSCHITZ, E. The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. **Development**, Cambridge, v. 125, n. 11, p. 1979-1989, June 1998.

POTTING, R. **Pest risk analysis: *Tuta absoluta***, tomato leaf miner moth. Wageningen: Plant Protection Service of the Netherlands, 2009. 24 p.

PRATISSOLI, D. **Bioecologia de *Trichogramma pretiosum* (Riley, 1879), nas traças *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick, 1917) e *Phthorimaea operculella* (Veller, 1873) em tomateiro**. 1995. 130 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

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

RICE, P.; LONGDEN, I.; BLEASBY, A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 276-277, June 2000.

RICH, A.; DAVIES, D.R. A new two-stranded helical structure: polyadenylic acid and polyuridylic acid. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 78, n. 14, p. 3548-3549, July 1956.

RICHARDS, S.; GIBBS, R.A.; WEINSTOCK, G.M.; BROWN, S.J.; DENELL, R.; BEEMAN, R.W.; GIBBS, R.; BEEMAN, R.W.; BROWN, S.J.; BUCHER, G.; FRIEDRICH, M.; GRIMMELIKHUIJZEN, C.J.; KLINGLER, M.; LORENZEN, M.; RICHARDS, S.; ROTH, S.; SCHRÖDER, R.; TAUTZ, D.; ZDOBNOV, E.M.; MUZNY, D.; GIBBS, R.A.; WEINSTOCK, G.M.; ATTAWAY, T.; BELL, S.; BUHAY, C.J.; CHANDRABOSE, M.N.; CHAVEZ, D.; CLERK-BLANKENBURG, K.P.; CREE, A.; DAO, M.; DAVIS, C.; CHACKO, J.; DINH, H.; DUGAN-ROCHA, S.; FOWLER, G.; GARNER, T.T.; GARNES, J.; GNIRKE, A.; HAWES, A.; HERNANDEZ, J.; HINES, S.; HOLDER, M.; HUME, J.; JHANGIANI, S.N.; JOSHI, V.; KHAN, Z.M.; JACKSON, L.; KOVAR, C.; KOWIS, A.; LEE, S.; LEWIS, L.R.; MARGOLIS, J.; MORGAN, M.; NAZARETH, L.V.; NGUYEN, N.; OKWUONU, G.; PARKER, D.; RICHARDS, S.; RUIZ, S.J.; SANTIBANEZ, J.; SAVARD, J.; SCHERER, S.E.; SCHNEIDER, B.; SODERGREN, E.; TAUTZ, D.; VATTAHIL, S.; VILLASANA, D.; WHITE, C.S.; WRIGHT, R.; PARK, Y.; BEEMAN, R.W.; LORD, J.; OPPERT, B.; LORENZEN, M.; BROWN, S.; WANG, L.; SAVARD, J.; TAUTZ, D.; RICHARDS, S.; WEINSTOCK, G.; GIBBS, R.A.; LIU, Y.; WORLEY, K.; WEINSTOCK, G.; ELSIK, C.G.; REESE, J.T.; ELHAIK, E.; LANDAN, G.; GRAUR, D.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P.; BEEMAN, R.W.; BEIDLER, J.; BROWN, S.J.; DEMUTH, J.P.; DRURY, D.W.; DU, Y.Z.; FUJIWARA, H.; LORENZEN, M.; MASELLI, V.; OSANAI, M.; PARK, Y.; ROBERTSON, H.M.; TU, Z.; WANG, J.J.; WANG, S.; RICHARDS, S.; SONG, H.; ZHANG, L.; SODERGREN, E.; WERNER, D.; STANKE, M.; MORGENSTERN, B.; SOLOVYEV, V.; KOSAREV, P.; BROWN, G.; CHEN, H.C.; ERMOLAEVA, O.; HLAVINA, W.; KAPUSTIN, Y.; KIRYUTIN, B.; KITTS, P.; MAGLOTT, D.; PRUITT, K.; SAPOJNIKOV, V.; SOUVOROV, A.; MACKAY, A.J.; WATERHOUSE, R.M.; WYDER, S.; ZDOBNOV, E.M.; ZDOBNOV, E.M.; WYDER, S.; KRIVENTSEVA, E.V.; KADOWAKI, T.; BORK, P.; ARANDA, M.; BAO, R.; BEERMANN, A.; BERNS, N.; BOLOGNESI, R.; BONNETON, F.; BOPP, D.; BROWN, S.J.; BUCHER, G.; BUTTS, T.; CHAUMOT, A.; DENELL, R.E.; FERRIER, D.E.; FRIEDRICH, M.; GORDON, C.M.; JINDRA, M.; KLINGLER, M.; LAN, Q.; LATTORFF, H.M.; LAUDET, V.; VON LEVETSOW, C.; LIU, Z.; LUTZ, R.; LYNCH, J.A.; FONSECA, R.N. da; POSNIEN, N.; REUTER, R.; ROTH, S.; SAVARD, J.; SCHINKO, J.B.; SCHMITT, C.; SCHOPPMEIER, M.; SCHRÖDER, R.; SHIPPY, T.D.; SIMONNET, F.; MARQUES-SOUZA, H.; TAUTZ, D.; TOMOYASU, Y.; TRAUNER, J.; VERVOORT, M.; WITTKOPP, N.; WIMMER, E.A.; YANG, X.; JONES, A.K.; SATTELLE, D.B.; EBERT, P.R.; NELSON, D.; SCOTT, J.G.; BEEMAN, R.W.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K.J.; ARAKANE, Y.; BEEMAN, R.W.; ZHU, Q.; HOGENKAMP, D.; DIXIT, R.; OPPERT, B.; JIANG, H.; ZOU, Z.; MARSHALL, J.; ELPIDINA, E.; VINOKUROV, K.; OPPERT, C.; ZOU, Z.; EVANS, J.; LU, Z.; ZHAO, P.; SUMATHIPALA, N.; ALTINCICEK, B.; VILCINSKAS, A.; WILLIAMS, M.; HULTMARK, D.; HETRU, C.; JIANG, H.; GRIMMELIKHUIJZEN, C.J.; HAUSER, F.; CAZZAMALI, G.; WILLIAMSON, M.; PARK, Y.; LI, B.; TANAKA, Y.; PREDEL, R.; NEUPERT, S.; SCHACHTNER, J.; VERLEYEN, P.; RAIBLE, F.; BORK, P.; FRIEDRICH, M.; WALDEN, K.K.; ROBERTSON, H.M.; ANGELI, S.; FORÊT, S.; BUCHER, G.; SCHUETZ, S.; MALESZKA, R.; WIMMER, E.A.; BEEMAN, R.W.; LORENZEN, M.; TOMOYASU, Y.; MILLER, S.C.; GROSSMANN, D.; BUCHER, G. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, London, v. 452, n. 7190, p. 949-955, Apr. 2008.

ROSA, C.; KAMITA, S.G.; DEQUINE, H.; WURIYANGHAN, H.; LINDBO, J.A.; FALK, B.W. RNAi effects on actin mRNAs in *Homalodisca vitripennis* cells. **Journal of RNAi and Gene Silencing**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 361-366, Apr. 2010.

SALAZAR, E.S.; ARAYA, J.E. Detección de resistencia a insecticidas em la polilla del tomate. **Simiente**, Santiago, v. 67, p. 8-22, 1997.

SCHULZ, M.H.; ZERBINO, D.R.; VINGRON, M.; BIRNEY, E. Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 1086-1092, Apr. 2012.

SCHWABE, J.W.R.; TEICHMANN, S.A. Nuclear Receptors: The Evolution of Diversity. **Science STKE**, Washington, v. 217, pe 4, Jan 2004.

SERRANI, J.; FOS, M.; GARCIA-MARTINEZ, J. Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv. Micro-Tom of tomato. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 26, n. 3, p. 211–221, Sept. 2007.

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

SIQUEIRA, H.A.A.; GUEDES, R.N.C.; PICANÇO, M.C. Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Agricultural and Forest Entomology**, Chichester, v. 2, n. 2, p. 147–153, May 2000.

SIQUEIRA, H.A.A.; GUEDES, R.N.C.; FRAGOSO, D.B.; MAGALHAES, L.C. Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **International Journal of Pest Management**, Abingdon, v. 47, n. 4, p. 247-251, Nov. 2001.

SOUZA, J.C.; REIS, P.R.; SALGADO, L.O. **Traça-do-tomateiro: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos e controle**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1992. 19 p. (Boletim Técnico, 38).

SPENCER, M.; FULLER, W.; WILKINS, M.; BROWN, G. Determination of the helical configuration of ribonucleic acid molecules by X-ray diffraction study of crystalline amino-acid-transfer ribonucleic acid. **Nature**, London, v. 194, p. 1014-1020, June 1962.

SUN, H.J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZIRA, H. A highly eficiente transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 426–431, Dec. 2006.

TABARA, H.; SARKISSIAN, M.; KELLY, W.G.; FLEENOR, J.; GRISHOK, A.; TIMMONS, L.; FIRE, A.; MELLO, C.C. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. **Cell**, Cambridge, v. 99, n. 2, p. 123–132, Oct. 1999.

TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W.; PRINCE, J.P., DE VICENTE, M.C.; BONIERBALE, M.W.; BROUN, P.; FULTON, T.M.; GIOVANNONI, J.J.; GRANDILLO, S.; MARTIN, G.B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J.C.; MILLER, L.; PATERSON, A.H.; PINEDA, O.; RÖDER, M.S.; WING, R.A.; WU, W.; YOUNG, N.D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, London, v. 132, n. 4, p. 1141–1160, Dec. 1992.

TIAN, H.G.; PENG, H.; YAO, Q.; CHEN, H.X.; XIE, Q.; TANG, B.; ZHANG, W.Q. Developmental control of a Lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. **PloS One**, San Francisco, v. 4, n. 7, July 2009. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0006225>>. Acesso em: 08 jan. 2012.

TOMOYASU, Y.; DENELL, R.E. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. **Development, Genes and Evolution**, Heidelberg, v. 214, n. 11, p. 575-578, Nov. 2004.

ULVILA, J.; PARIKKA, M.; KLEINO, A.; SORMUNEN, R.; EZEKOWITZ, R.A.; KOCKS, C.; RAMET, M. Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptor-mediated endocytosis in *Drosophila* S2 cells. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 281, n. 20, p. 14370-14375, May 2006.

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

VAGIN, V.V.; SIGOVA, A.; LI, C.; SEITZ, H.; GVOZDEV, V.; ZAMORE1, P.D. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. **Science**, Washington, v. 313, n. 320, p. 320-324, July 2006.

VARKONYI-GASIC, E.; WU, R.; WOOD, M.; WALTON, E.F.; HELLENS, R.P. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. **Plant Methods**, London, v. 3, n. 12, p. 1-19, Oct. 2007.

VAZQUEZ, F.; GASCIOLLI, V.; CRETE, P.; VAUCHERET, H. The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. **Current Biology**, Cambridge, v. 14, n. 4, p. 346-351, Feb. 2004.

VAZQUEZ, F.; VAUCHERET, H.; RAJAGOPALAN, R.; LEPERS, C.; GASCIOLLI, V.; MALLORY, A.C.; HILBERT, J.L.; BARTEL, D.P. CRÉTÉ, P. Endogenous *trans*-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 69-79, Oct. 2004.

VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R.J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, n. 13, p. 3688-3691, July 2003.

XIA, Q.; XIA, Q.; ZHOU, Z.; LU, C.; CHENG, D.; DAI, F.; LI, B.; ZHAO, P.; ZHA, X.; CHENG, T.; CHAI, C.; PAN, G.; XU, J.; LIU, C.; LIN, Y.; QIAN, J.; HOU, Y.; WU, Z.; LI, G.; PAN, M.; LI, C.; SHEN, Y.; LAN, X.; YUAN, L.; LI, T.; XU, H.; YANG, G.; WAN, Y.; ZHU, Y.; YU, M.; SHEN, W.; WU, D.; XIANG, Z.; YU, J.; WANG, J.; LI, R.; SHI, J.; LI, H.; LI, G.; SU, J.; WANG, X.; LI, G.; ZHANG, Z.; WU, Q.; LI, J.; ZHANG, Q.; WEI, N.; XU, J.; SUN, H.; DONG, L.; LIU, D.; ZHAO, S.; ZHAO, X.; MENG, Q.; LAN, F.; HUANG, X.; LI, Y.; FANG, L.; LI, C.; LI, D.; SUN, Y.; ZHANG, Z.; YANG, Z.; HUANG, Y.; XI, Y.; QI, Q.; HE, D.; HUANG, H.; ZHANG, X.; WANG, Z.; LI, W.; CAO, Y.; YU, Y.; YU, H.; LI, J.; YE, J.; CHEN, H.; ZHOU, Y.; LIU, B.; WANG, J.; YE, J.; JI, H.; LI, S.; NI, P.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; ZHENG, H.; MAO, B.; WANG, W.; YE, C.; LI, S.; WANG, J.; WONG, G.K.; YANG, H. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombix mori*). **Science**, Washington, v. 306, n. 5703, p. 1937-1940, Dec. 2004.

WASSENEGGER, M.; HEIMES, S.; RIEDEL, L.; SANGER, H.L. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. **Cell**, Cambridge, v. 76, n. 3, p. 567-576, Feb. 1994.

WATSON, J.D.; CRICK, F.H.C. A structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, London, v. 171, n. 3, p. 737-738, Apr. 1953.

WEISSMANN, C.; BORST, P.; BURDON, R.; BILLETTER, M.; OCHOA, S. Replication of viral RNA, III. Double-stranded replicative form of MSW phage RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 51, p. 682-690, Apr. 1964.

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

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, Cambridge, v. 75, n. 5, p. 855-862, Dec. 1993.

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

WINSTON, W.M.; SUTHERLIN, M.; WRIGHT, A.J.; FEINBERG, E.H.; HUNTER, C.P. *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 25, p. 10565-10570, June 2007.

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

ZHAO, Y.Y.; YANG, G.; WANG-PRUSKI, G.; YOU, M.S. *Phyllotreta striolata* (Coleoptera: Chrysomelidae): arginine kinase cloning and RNAi-based pest control. **European Journal of Entomology**, Ceske Budejovice, v. 105, n. 5, p. 815-822, Dec. 2008.

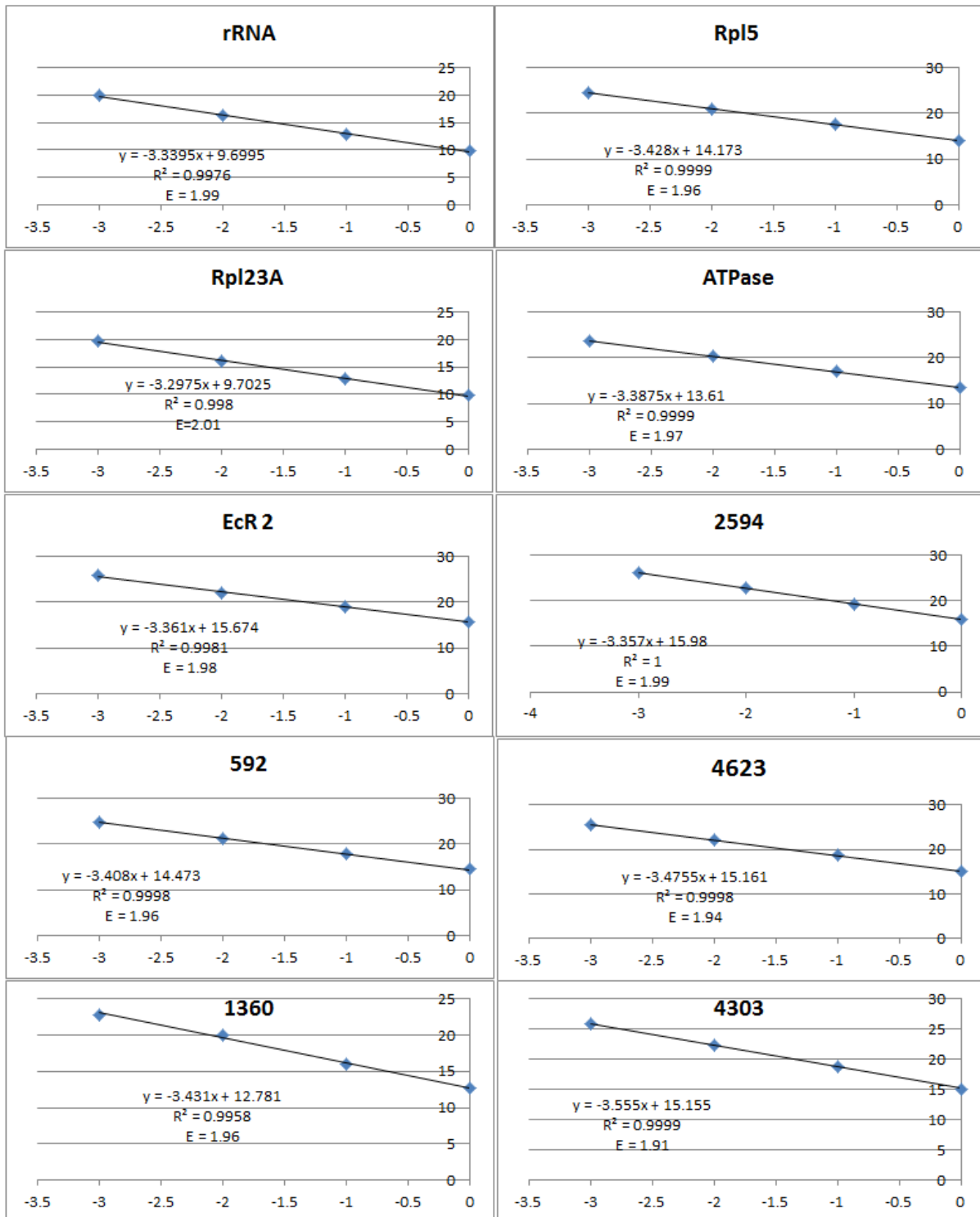
ZHAO, Y.Y.; LIU, F.; YANG, G.; YOU, M.S. PsOr1, a potential target for RNA interference-based pest management. **Insect Molecular Biology**, Chichester, v. 20, n. 1, p. 97-104, Feb. 2011.

ZHU, F.; XU, J.; PALLI, R.; FERGUSON, J.; PALLI, S.R. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. **Pest Management Science**, Chichester, v. 67, n. 2, p. 175-182, Feb. 2011.

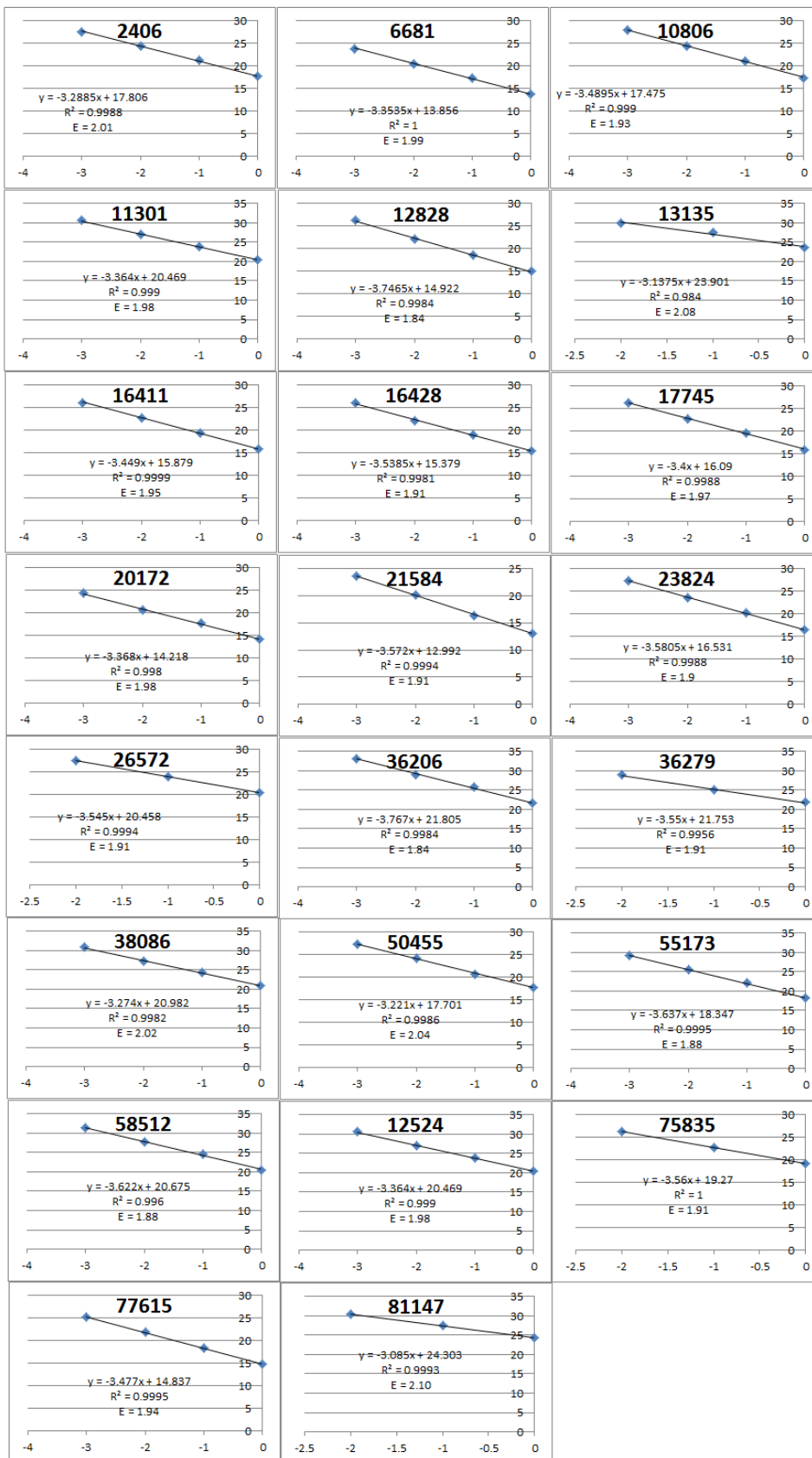
ZRACHYA, A.; KUMAR, P.P.; RAMAKRISHNAN, U.; LEVY, Y.; LOYTER, A.; ARAZI, T.; LAPIDOT, M.; GAFNI, Y. Production of siRNA targeted against TYLCV coat protein transcripts leads to silencing of its expression and resistance to the virus. **Transgenic Research**, London, v. 16, n.3, p. 385–398, June 2007.

ZSOGON, A.; LAMBAIS, M.R.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; PERES, L.E.P. Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 3, p. 259–267, May 2008.

ANEXOS



ANEXO A – Gráficos das análises de regressão linear obtida por meio da diluição seriada, para cálculo da eficiência (E) dos primers utilizados nos experimentos de RT-qPCR dos ensaios de alimentação. Todos os gráficos possuem no eixo X os valores logarítmicos da concentração e no eixo Y os Cts obtidos nas reações



ANEXO B - Gráficos das análises de regressão linear obtida por meio da diluição seriada, para cálculo da eficiência (E) dos primers utilizados nos experimentos de RT-qPCR para validação do RNA-seq. Todos os gráficos possuem no eixo X os valores logarítmicos da concentração e no eixo Y os Cts obtidos nas reações