

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PEDRO HENRIQUE DE ANDRADE AFFONSO

Avaliação da Eficácia de RNAs de Interferência para o Manejo de Pragas

BOTUCATU
2023

PEDRO HENRIQUE DE ANDRADE AFFONSO

Avaliação da Eficácia de RNAs de Interferência para o Manejo de Pragas

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências de Botucatu para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jayme Augusto de Souza Neto

Coorientador: Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini

BOTUCATU
2023

A257a

Affonso, Pedro Henrique de Andrade

Avaliação da Eficácia de RNAs de Interferência para o Manejo de Pragas / Pedro Henrique de Andrade Affonso. -- Botucatu, 2023

71 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Jayme Augusto de Souza Neto

Coorientador: Edivaldo Domingues Velini

1. Manejo de pragas. 2. RNA de interferência. 3. Biotecnologia ambiental. 4. Controle entomológico. I. Título.

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Jayme Augusto de Souza Neto, brasileiro, casado, professor universitário, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da DISSERTAÇÃO, intitulada "Avaliação da Eficácia de RNAs de Interferência para o Manejo de Pragas", desenvolvida pelo mestrando PEDRO HENRIQUE DE ANDRADE AFFONSO, da Unidade do INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da dissertação a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

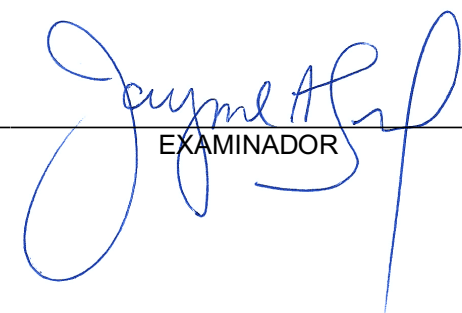
Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de Botucatu/SP, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firmo o presente termo.

Botucatu, 16 de novembro de 2023.



EXAMINADOR

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Rejane Maria Tommasini Grotto, brasileira, professora universitária, doravante denominada **EXAMINADORA**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma a EXAMINADORA o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. A EXAMINADORA compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer “Informação Confidencial” a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da DISSERTAÇÃO, intitulada “Avaliação da Eficácia de RNAs de Interferência para o Manejo de Pragas”, desenvolvida pelo mestrando PEDRO HENRIQUE DE ANDRADE AFFONSO, da Unidade do INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão “Informação Confidencial” abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da dissertação a que a EXAMINADORA tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada “Informação Confidencial” aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada à EXAMINADORA.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de Botucatu/SP, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firmo o presente termo.

Botucatu, 16 de novembro de 2023.

Documento assinado digitalmente
 **REJANE MARIA TOMMASINI GROTTTO**
Data: 17/11/2023 09:05:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

EXAMINADORA

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Valber de Albuquerque Pedrosa, brasileiro, professor universitário, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da DISSERTAÇÃO, intitulada "Avaliação da Eficácia de RNAs de Interferência para o Manejo de Pragas", desenvolvida pelo mestrando PEDRO HENRIQUE DE ANDRADE AFFONSO, da Unidade do INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da dissertação a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de Botucatu/SP, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firmo o presente termo.

Botucatu, 16 de novembro de 2023.



EXAMINADOR

Nome: AFFONSO, Pedro Henrique de Andrade

Título: Avaliação da Eficácia de RNAs de Interferência para o Manejo de Pragas

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências de Botucatu para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Defesa realizada em 11 /12 /2023.

AGRADECIMENTOS

À Santo Antônio Energia e à RNX - Pesquisas Ltda., agradeço pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa. Ao NUPAM, laboratório parceiro, agradeço a todos que me auxiliaram.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jayme Augusto de Souza Neto e ao meu coorientador, Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini agradeço pela confiança, apoio e atenção durante o desenvolvimento deste estudo.

Toda a gratidão a minha mãe e ao meu pai, que sempre incentivaram a continuidade da minha trajetória acadêmica.

Ao Adauto, Amanda, Patrícia, Nathália e Milena que me acompanharam e apoiaram durante este processo, meu muito obrigado.

RESUMO

O manejo de pragas é essencial para garantir não somente a produtividade e a qualidade dos cultivos agrícolas, mas também a biodiversidade nativa, uma vez que também é utilizado para o controle de espécies invasoras. No Brasil, visando um maior custo-benefício à curto prazo, utiliza-se massivamente o controle químico como principal forma de manejo de pragas. Este controle consiste na aplicação de químicos, como inseticidas, herbicidas e fungicidas. No entanto, o uso excessivo de agroquímicos pode levar, a longo prazo, ao surgimento de pragas cada vez mais resistentes, além de causar impactos negativos na saúde humana e no meio ambiente. Apesar das formas controle alternativas como o controle biológico e mecânico sejam ambientalmente mais sustentáveis, ainda não são capazes de substituir integralmente o método de controle químico, principalmente em culturas extensivas. A partir dessa problemática, recentemente tem crescido uma nova abordagem. A via de RNAi, é conservada em todos os eucariontes e é normalmente utilizada pelo próprio organismo como uma forma de regular a expressão de genes. Como forma de manejo, baseia-se no reconhecimento de moléculas efectoras desta via, os siRNAs ou dsRNAs, construídos especificamente para atingir a expressão de genes que resultem na diminuição populacional da espécie-alvo. O objetivo dessa dissertação é, portanto, encontrar e avaliar potenciais transcritos-alvos relacionados com a sobrevivência de pragas vegetais e na degradação de agroquímicos em *Spodoptera frugiperda*. O estudo utilizou *Glycine max* como espécie modelo pragas vegetais, trazendo como alvo dois genes, GmA1 e GmA2, comuns à indústria de herbicidas. O silenciamento do gene GmA1, contra-intuitivamente resultou em sua superexpressão nos dois dias avaliados. Enquanto GmA2 demonstrou alta suscetibilidade ao silenciamento durante o mesmo período. Já os resultados de translocação em plantas, indicaram que o efector de dsRNA não foi capaz de se translocar para tecidos aos quais ele não foi aplicado, como caule, raízes e folhas secundárias. Por fim, para os ensaios com *Spodoptera frugiperda*, foram idealizados cinco alvos relacionados a detoxificação de diferentes classes de defensivos agroquímicos, SfA1, SfA2, SfA3, SfA4 e SfA5. Entretanto, apenas a expressão basal do gene SfA2 foi alta o suficiente para permitir a continuidade do silenciamento. O gene SfA2, apresentou altos níveis de modulação negativa durante o primeiro dia pós-microinjeção dos dsRNAs, seguida por modulações divergentes, a depender do instar larval, até o quarto dia, quando a sua expressão retornou aos níveis basais. O comportamento de silenciamento das expressões de GmA2 em *Glycine max* e SfA2 em *Spodoptera frugiperda*, sugerem se tratar de genes com um alto potencial para esta abordagem, visando o manejo integrado em pragas; ainda que, haja a necessidade de estudos mais aprofundados em excipientes e coadjuvantes que confirmem maior propriedades de absorção, resistência a degradação, entre outras características, para viabilizar sua aplicação prática em campo e no desenvolvimento comercial de produtos.

Palavras-chave: Manejo de pragas. RNA de interferência. Biotecnologia ambiental. Controle entomológico.

ABSTRACT

Pest management is essential to ensure not only the productivity and quality of agricultural crops but also native biodiversity, once it can be used to control the spread of invasive species. In Brazil, aiming for a shorter-term and higher cost-benefit production, the chemical control still the predominant form of pest management used. This form of management consists in the application of chemicals such as insecticides, herbicides, and fungicides. However, the excessive use of agrochemicals for a long-term can lead not only to the emergence of resistance in pests, but also cause negative impacts on human health and to the environment. Despite alternative control methods, such as biological control and mechanical control, being more environmentally sustainable, they are not yet capable of fully replacing the chemical control, especially in extensive crops management. Due this issue, a new approach has recently emerged. The RNAi pathway, is conserved in all eukaryotes, commonly used as a way to regulate gene expression, is now being explored for pest management. In this approach, the idea is to force the pathway to recognizes an exogenous supply of a RNA molecule —siRNAs or dsRNAs — specifically designed to target the expression of genes related to the survival of pests. The aim of this dissertation is to identify and evaluate potential genes related with the survival of invasive plants and the degradation of agrochemicals in *Spodoptera frugiperda*. The study used *Glycine max* as a model-specie for plants, targeting two genes, GmA1 and GmA2, commonly used by the herbicide industry. The silencing of the GmA1 gene, counterintuitively, resulted in its overexpression on both days evaluated, while GmA2 showed high susceptibility to silencing during the same period. Regarding the plant translocation assays, the dsRNA effector was unable to translocate to tissues where it was not applied, such as stems, roots, and secondary leaves. In *Spodoptera frugiperda*, five target-genes were used, all related with the detoxification of agrochemicals, but of different chemical class —SfA1, SfA2, SfA3, SfA4, and SfA5 — were designed. However, only the basal expression of the SfA2 gene was high enough to allow for the continuity of silencing method. SfA2 gene presented high knockdown susceptibility after the first day of dsRNA microinjection, followed by divergent modulations, depending on the instar collected, until the fourth day when the expression of SfA2 returned to standard levels. The post-silencing expression resulted from GmA2 in *Glycine max* and SfA2 in *Spodoptera frugiperda* indicated that these genes have a high potential for further studies as complementary tool in an integrated pest management. However, studies on excipients and adjuvants are needed to provide greater absorption properties, resistance to degradation, and other characteristics to enable their practical application in field crops or even to the development of commercial products.

Keywords: Pest management. RNA interference. Environmental biotechnology. Entomological control.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos complementares aos transcritos de GmA1 e GmA2 em <i>Glycine max</i> para síntese de dsRNA e expressão relativa, bem como as sequências de <i>primers</i> para o gene constitutivo (Actina 7) e para a síntese do dsRNA para o grupo controle (AaC1 – <i>Aedes aegypti</i>).	47
Tabela 2. Sequências de siRNA para o silenciamento de GmA1 e GmA2 em <i>Glycine max</i> . A identificação em negrito ao final do nome das sequências indica o sentido da fita, sendo S para <i>sense</i> e AS para <i>anti-sense</i>	48
Tabela 3. Valores deduzidos ao longo da avaliação de eficiência de reação para cada par de <i>primers</i> utilizados para avaliar a expressão relativa de GmA1 e GmA2, bem como do constitutivo Actina 7 em <i>Glycine max</i>	50
Tabela 4. Sequências de <i>primers</i> para AaC2 de <i>Aedes aegypti</i> utilizados na síntese de dsRNA e na detecção qualitativa do próprio dsRNA por RT-qPCR.	50
Tabela 5. Dimensões foliares e o consequente volume de solução efetora com dsRNA-inerte aplicado. O coeficiente de ajuste da área foliar foi de 0,7.	51
Tabela 6. Sequências de oligonucleotídeos para os transcritos dos genes SfA1, SfA2, SfA3, SfA4 e SfA5 de <i>Spodoptera frugiperda</i> para síntese de dsRNA e expressão relativa, bem como o par de óligos para o gene constitutivo GAPDH e BtC1 para síntese do dsRNA aplicado nos grupos controle negativo.	55
Tabela 7. Valores deduzidos ao longo da avaliação de eficiência de reação para cada par de <i>primers</i> utilizados para avaliar a expressão relativa dos diferentes transcritos-alvo, bem como do constitutivo GAPDH de <i>Spodoptera frugiperda</i>	57

LISTA DE FÓRMULAS

- Fórmula 1.** Cálculo para deduzir o valor de eficiência de reação um determinado par de *primers*. Onde E é o valor de eficiência; e *Slope* é o coeficiente angular da equação da reta formada a partir dos valores de CT. 42
- Fórmula 2.** Cálculo de expressão relativa pelo método de Pfaffl para obter os valores de *Fold Change* de cada amostra. 44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Apresentação esquemática das metodologias utilizadas durante esta pesquisa para avaliação da translocação do dsRNA-inerte e de potenciais efetores de RNA para o controle de pragas vegetais utilizando <i>Glycine max</i> como modelo.	31
Figura 2. Apresentação esquemática das metodologias utilizadas durante este projeto para avaliação dos potenciais efetores de dsRNA para controle de <i>Spodoptera frugiperda</i>	32
Figura 3. Resumo esquemático da metodologia utilizada para o ensaio avaliação de silenciamento de <i>Glycine max</i> . Apresentando os tempos de coleta dos discos de folha e o processamento das amostras até a validação do silenciamento por RT-qPCR.	36
Figura 4. Microaplicação das soluções de dsRNA-inerte na superfície foliar de <i>Glycine max</i> . (A) Fotos durante e após a microaplicação com micropipeta. (B) Representação esquemática que apresenta como foi deduzido o volume de aplicação de solução de RNA-inerte para cada folha aplicada, onde: Ø = diâmetro; C = área circular da folha; e $A \approx$ = área foliar ajustada.	37
Figura 5. Resumo esquemático da metodologia utilizada para o ensaio de translocação em plantas. Apresentando: os tempos de coleta; os diferentes tecidos segmentados; e o processamento das amostras até a detecção do RNA-inerte em <i>Glycine max</i>	38
Figura 6. Esquemas de eficiência de reação. (A) Exemplo de diluição seriada de cDNA para um fator de diluição 10 (v/v) e volume útil de 45 µL para cada concentração. (B) Exemplo de obtenção do valor de <i>Slope</i> de um par de <i>primers</i> fictício.	42
Figura 7. Mapa com a localização dos diferentes óligos utilizados para o silenciamento e detecção dos transcritos de GmA1 em <i>Glycine max</i> . As linhas em preto representam a sequência do transcrito, enquanto os elementos: Verde= dsRNA; Cinza= siRNAs; Vermelho = <i>amplicon</i> para expressão relativa; Roxo= <i>primers</i>	49
Figura 8. Mapa com a localização dos diferentes óligos utilizados para o silenciamento e detecção dos transcritos de GmA2 em <i>Glycine max</i> . As linhas em preto representam a sequência do transcrito, enquanto os elementos: Verde= dsRNA; Cinza= siRNAs; Vermelho ou Marrom= <i>amplicons</i> para expressão relativa; Roxo= <i>primers</i>	49

Figura 9. Dados de detecção do AaC2-dsRNA em diferentes tecidos. Para o controle positivo (C+) foi utilizado uma solução do dsRNA a 25 ng/uL como *template* na reação de RT-qPCR. Enquanto para os controles negativos (C-) foi microaplicado 46µL água osmose reversa autoclavada com adição de Assist® EC (BASF) a 0,2% (v/v) nas superfícies foliares. 51

Figura 10. Validação do silenciamento do transcrito de GmA2 por expressão relativa durante 1 e 2 dias de absorção das soluções com diferentes efetores da via de RNAi. Foi utilizado o teste-T bicaudal pareado para as análises estatísticas, em que ****= $Pvalue < 0,0001$. As retas $y = 1$ dos gráficos representam a expressão das amostras do grupo controle (AaC1-dsRNA). A expressão dos genes foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Actina 7. **(A)** Resultados para o primeiro par de *primers*, GmA2-qPCR. **(B)** Resultados para o segundo par de *primers*, GmA2-qPCR-2. 52

Figura 11. Avaliação da modulação do transcrito de GmA1 por expressão relativa durante 1 e 2 dias de absorção das soluções com diferentes efetores de RNA. Foi utilizado o teste-T bicaudal pareado para as análises estatísticas, em que * = $Pvalue < 0,05$, ** = $Pvalue < 0,01$ e ns = não significativo. A reta $y = 1$ do gráfico representa a expressão das amostras do grupo controle (AaC1-dsRNA). A expressão dos genes foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Actina 7. 53

Figura 12. Mapa com a localização dos diferentes oligos utilizados para o silenciamento e detecção dos transcritos-alvo. As linhas em preto representam a sequência do transcrito, enquanto os elementos: Azul= dsRNAs; Vermelho ou Marrom= *amplicons* para expressão relativa; Roxo= *primers*. **(A)** Mapa dos oligos referentes ao alvo SfA1. **(B)** Mapa dos oligos referentes ao alvo SfA2. **(C)** Mapa dos oligos referentes ao alvo SfA3. **(D)** Mapa dos oligos referentes ao alvo SfA4. **(E)** Mapa dos oligos referentes ao alvo SfA5. 56

Figura 13. Validação do silenciamento e dinâmica de expressão do transcrito de SfA2 em *Spodoptera frugiperda* por expressão relativa durante 1, 2 e 4 dias pós-microinjeção com dsRNA. As barras em preto representam a expressão das amostras do grupo controle (BtC1). A expressão dos genes foi normalizada em função da expressão do constitutivo GAPDH. No eixo X do gráfico também são apresentadas as faixas de instares larvais encontradas em cada grupo amostral, variando entre o terceiro (L3) e o sexto instar (L6) nas coletas mais tardias. Foi utilizado o teste-T bicaudal não-pareado para as análises estatísticas, em que * = $Pvalue < 0,05$, ** = $Pvalue < 0,01$, *** = $Pvalue < 0,005$ e ns = não significativo. 58

LISTA DE SIGLAS

(m/v)	Relação massa por volume
(v/v)	Relação volume por volume
≅	Aproximadamente
BLAST	Ferramenta de Alinhamento Local Básico
bp	Pares de base
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
cDNA	DNA complementar
CT	Ciclo de Threshold
DNAse	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
dsRNA	RNA dupla fita
E	Eficiência de Reação
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
dsRNA	RNA dupla-fita
ha	Hectare
L1	Primeiro instar larval
L2	Segundo instar larval
L3	Terceiro instar larval
L4	Quarto instar larval
L5	Quinto instar larval
L6	Sexto instar larval
m	10^{-3}
M	Molar

mRNA	RNA mensageiro
n	10^{-9}
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ø	Diâmetro
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ppm	Parte por milhão
RNAi	RNA de Interferência
RNAse	Ribonuclease
RO	Rondônia
rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
siRNA	Pequeno RNA de Interferência
U	Unidade de enzima proporcional a uma reação com velocidade de $1 \mu\text{mol/min}$
μ	10^{-6}

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
SUMÁRIO	xvi
OBJETIVOS	xviii
1 PROBLEMÁTICAS	19
1.1 Controle de Praga Vegetal	20
1.2 Controle de Praga Entomológica	21
2 VIA DE RNA DE INTERFERÊNCIA	23
2.1 Mecanística da Via de Pequenos RNA de Interferência	24
2.2 Via de siRNA no Controle de Pragas	26
3 METODOLOGIA	28
3.1 Manutenção das Plantas e Insetos	28
3.1.1 <i>Spodoptera frugiperda</i>	28
3.1.2 <i>Glycine max</i>	29
3.2 Design dos Efetores de RNA	29
3.2.1 Primers para Síntese de dsRNA e Análise de Expressão Gênica	30
3.2.2 Design dos siRNAs	31
3.3 Ensaios de Silenciamento	31
3.3.1 Obtenção dos Efetores de RNA	33
3.3.2 Purificação e Ajustes de Concentração dos RNAs	33
3.3.3 Ensaio de Silenciamento em Insetos	34
3.3.4 Ensaio de Silenciamento em Discos de Folha	35
3.3.5 Ensaio de Translocação em Plantas	36
3.4 Extração de RNA Total	39
3.4.1 Extração de RNA de Plantas	39
3.4.2 Extração de RNA de Insetos	39
3.4.3 Tratamento com DNase	40
3.5 Síntese de DNA Complementar	41
3.5.1 Síntese de DNA Complementar para Plantas	41
3.5.2 Síntese de DNA Complementar para Insetos	41
3.6 Análise de Eficiência de Reação	42
3.7 Análise de Expressão Relativa por RT-qPCR	43
3.7.1 Preparação em Bancada	43
3.7.2 Processamento de Dados	43
3.8 Análise Qualitativa por RT-qPCR	44
4 RESULTADOS	46
4.1 Resultados para <i>Glycine max</i>	46
4.1.1 Efetores de RNA para <i>Glycine max</i>	46
4.1.1.1 Óligos Relacionados com o Silenciamento de <i>Glycine max</i>	47

4.1.1.2	Alvos e Localização dos Óligos Relacionados com o Silenciamento de <i>Glycine max</i>	48
4.1.2	Eficiência de Reação para Expressão Relativa em <i>Glycine max</i>	50
4.1.3	Análise da Translocação de dsRNA em <i>Glycine max</i>	50
4.1.4	Silenciamento em <i>Glycine max</i>	52
4.2	Resultados para <i>Spodoptera frugiperda</i>.....	54
4.2.1	Efetores de RNA para <i>Spodoptera frugiperda</i>	54
4.2.1.1	Óligos Relacionados com o Silenciamento de <i>Spodoptera frugiperda</i> .	54
4.2.1.2	Alvos e Localização dos Óligos Relacionados com o Silenciamento de <i>Spodoptera frugiperda</i>	55
4.2.2	Eficiência de Reação para Expressão Relativa em <i>Spodoptera frugiperda</i>	57
4.2.3	Silenciamento em <i>Spodoptera frugiperda</i>	58
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Atender as problemáticas fornecidas pelas empresas fomentadoras, identificando e avaliando alvos-transcricionais com potencial ao manejo integrado, em pragas vegetais e entomológicas.

Objetivos Específicos:

- Avaliar a translocação de efetores da via de RNA de interferência em plantas;
- Identificar e avaliar o silenciamento de transcritos relacionados com a sobrevivência de plantas;
- Identificar e avaliar o silenciamento de transcritos relacionados a degradação de defensivos agrícolas em *Spodoptera frugiperda*.

1 PROBLEMÁTICAS

A via de RNA de interferência (RNAi) é um processo biológico natural presente em todos os eucariontes, responsável por uma das regulações pós-transcricionais mais finas da expressão gênica. Este mecanismo também é referido como ‘silenciamento gênico’ e foi inicialmente descrito por Fire et al. (1998) no nematóide *Caenorhabditis elegans*. Desde sua descoberta, os mecanismos da via de RNAi têm sido amplamente utilizados como uma valiosa ferramenta de genética reversa para investigar a função de genes. Além disso, é considerada uma aposta promissora no controle de pragas (DALAKOURAS et al., 2020; DAS; SHERIF, 2020; DUBROVINA; KISELEV, 2019; ZHANG et al., 2015; CAI et al. 2018).

Este projeto se propõe a avaliar a eficiência da administração de moléculas efetoras da via RNA de interferência, os pequenos RNAs de interferência (siRNAs) ou os RNAs dupla fita (dsRNA), com potencial para silenciar a expressão de genes-chave envolvidos na sobrevivência, no desenvolvimento e na degradação de agroquímicos em pragas agrícolas. Essa abordagem promissora foi aplicada em duas problemáticas derivadas das empresas que

fomentaram este projeto. Uma envolvendo o controle de pragas vegetais e a outra o controle de pragas entomológicas. Os detalhes de cada uma dessas problemáticas estão descritos abaixo.

1.1 Controle de Praga Vegetal

As macrófitas aquáticas são plantas que se desenvolvem em ambientes aquáticos ou em solos permanentemente encharcados. Em condições harmônicas, a integração de diferentes espécies de macrófitas compõem parte de um ecossistema complexo que exerce um importante serviço ambiental. Entretanto, podem facilmente realizar o papel de pragas em ambientes hídricos com desequilíbrio ecológico, normalmente por interferências antrópicas (THOMAZ; CUNHA, 2010; GENTELINI et al. 2008, MALAVOLTA et al., 1989; MEDEIROS et al., 1999).

A colonização desarmônica de macrófitas aquáticas normalmente inicia-se nas bordas de corpos d'água. Uma vez estabelecidas, rapidamente permitem a formação indiscriminada de biomassas vegetais, microrganismos e animais oportunistas que trazem danos biocenóticos ao corpo hídrico. Neste sentido, são necessárias medidas para controle de macrófitas aquáticas para prevenir o início desse ciclo que culmina em potenciais efeitos negativos ao meio-ambiente, a sociedade, e à própria utilização antrópica destes recursos hídricos (THOMAZ; BINI; PAGIORO, 2003).

O reservatório da Usina Hidrelétrica Santo Antônio em Porto Velho-RO, vem enfrentando problemáticas com o surgimento de grandes áreas de colonização de macrófitas flutuantes e suas epífitas espalhadas; bem como uma colonização intensa de plantas marginais nas bordas, levando a formação de grandes biomassas vegetais que interferem na geração de energia elétrica e elevam os custos de manutenção e operação.

Adicionalmente, houve um grande aumento na população de mosquitos do gênero *Mansonia*, que possuem como reservatório os sistemas radiculares de macrófitas, especialmente da espécie *Eichhornia crassipes*, popularmente conhecida como aguapé.

Os principais tipos de controle utilizados atualmente são: o controle mecânico, com a retirada física da biomassa; químico, com a utilização de herbicidas; e o controle biológico, através de organismos que sejam capazes de suprimir a população.

Entretanto, estes métodos podem apresentar algumas desvantagens como: a baixa eficiência na remoção mecânica nas áreas afetadas; a falta de especificidade do controle químico atual; e a dificuldade para disseminação de organismos capazes de suprimir a população de forma eficiente. Desse modo, é crucial buscar abordagens mais consistentes e ecologicamente neutras para enfrentar esse quadro que gera desde de perda de produtividade, até o descontrole populacional de vetores intimamente ligados a saúde pública da população local (BAKER; GREEN; LOKER, 2020).

Dentro desta problemática, a utilização da abordagem de RNA de interferência surge como uma adição ao controle integrado de espécies de pragas vegetais (ZOTTI et al., 2018; MAJUMDAR; RAJASEKARAN; CARY, 2017; ZOTTI; SMAGGHE, 2015; PALLI, 2014).

1.2 Controle de Praga Entomológica

A *Spodoptera frugiperda*, mais conhecida como lagarta-do-cartucho-de-milho é uma das pragas mais destrutivas nas lavouras de milho. A infestação desta espécie no campo pode causar perdas significativas neste tipo de produção, levando a prejuízos econômicos consideráveis para os agricultores (MONTEZANO et al., 2018; WANG, et al. 2020).

Os principais tipos de controle utilizados atualmente são: o controle químico, com a utilização de larvicidas/inseticidas (BOLZAN et al., 2019; LIRA et al., 2020); controle biológico, através de organismos que sejam capazes de suprimir a população, como vespas *Trichogramma* spp., joaninhas e crisopídeos (JARALEÑO-TENIENTE et al., 2020; MURILLO, 2014); e por fim, o cultivo de culturas OGM resistentes a pragas, como a soja RR, o algodão Bt e o milho Bt.

De forma pragmática, o método mais comumente utilizado é integração de variantes OGM somado ao uso extensivo de defensivos agrícolas. Entretanto, essa abordagem cria um ambiente de seleção artificial para a lagarta-do-cartucho-de-milho, bem como outras pragas entomológicas, que acaba por favorecer o surgimento de mutações que conferem resistência a estes agroquímicos nestas populações (STORER et al., 2010).

Visando mitigar a criação de populações de *Spodoptera frugiperda* cada vez mais resistentes à defensivos agrícolas, a RNX Pesquisas Avançadas em RNA de Interferência Ltda. fomentou parte deste projeto com a projeção de criar um produto a base de efetores da via de RNAi (RODRÍGUEZ-DE LA NOVAL et al. 2019; RODRÍGUEZ-CABRERA et al. 2010; ZOTTI et al, 2018; ZOTTI; SMAGGHE, 2015; GIRAUDO et al. 2015; YANG et al., 2017; TAN et al., 2022). Idealmente, este produto co-aplicado com defensivos teria a capacidade de ressensibilizar temporariamente a *Spodoptera frugiperda*, atingindo os transcritos de genes-alvo que possuam a função de degradação de classes específicas de agroquímicos.

Desta forma, promovendo o controle efetivo da *Spodoptera frugiperda* ao mesmo tempo que garante a segurança alimentar, a estabilidade dos preços dos alimentos e o suprimento adequado de milho para alimentação direta, mas também para as indústrias de processamento e para a produção de ração animal.

2 VIA DE RNA DE INTERFERÊNCIA

A via de RNA de interferência tem como principais funções a regulação da expressão gênica do próprio indivíduo ou de agentes exógenos (CHRISTIAENS; NIU; TANING, 2020; O'KEEFE, 2013; DUBROVINA; KISELEV, 2019; DALAKOURAS et al., 2020; DAS; SHERIF, 2020). A sua atuação gera uma interferência alvo-específica, tanto pós-transcricional nos RNAs mensageiros (mRNAs), quanto em alguns casos pré-transcricionais no nível de condensação da cromatina do gene alvo. Além disso, atua na proteção contra elementos móveis e consequentemente contra o desenvolvimento de infecções de determinadas classes virais (MUHAMMAD et al., 2019; MITTER et al., 2019).

A via de RNAi possui três tipos de RNAs efetores descritos, cada qual possui sua própria via de síntese e mecanismos de ação. São eles: os pequenos RNAs de interferência (siRNAs); micro RNAs (miRNAs); e *piwi-associated* RNA (piRNAs). Apesar de bem distintos, boa parte dos mecanismos de síntese e mecanismos de ação utilizam as mesmas famílias de proteína, sendo as principais a Dicer (DCR) e os complexos RISC com uma das enzimas da superfamília Argonauta (AGO).

A DCR é uma enzima constituída por diversos domínios: N-terminal DEXH-box RNA helicase; DUF283; dois domínios ribonuclease RIIIa e RIIIb; e um domínio PAZ. A função da Dicer é de clivar dsRNAs palindrômicos ou por fitas independentes, mas também de passar os RNAs gerados por ela para o complexo RISC. Já a RISC, é um complexo multiprotéico formado principalmente por proteínas da superfamília AGO. Sendo essa, caracterizada pela presença de duas regiões conservadas, dentre elas, o domínio PAZ, que realiza a conjugação dos miRNAs, siRNAs ou piRNAs com o RNA mensageiro, tornando o complexo RISC ativo e capaz de atingir especificamente um transcrito-alvo (NOWOTNY; YANG, 2009; AMARAL; DANSA-PETRETSKI, 2012).

Dos efetoires supracitados, a via de siRNA despertou o interesse da genômica funcional, uma vez que possui uma ramificação dedicada ao reconhecimento de precursores exógenos. Este braço da via, permite a criação de ferramentas de modulação genica altamente específicas que nas últimas décadas vêm sendo exploradas de forma mais aplicada na área farmacêutica, ambiental e agrônômica. Tendo em vista as informações descritas, a seguir é apresentada de forma mais detalhada a mecanística por traz da via de siRNA, bem como o estado atual da arte desta ferramenta dedicada ao controle de pragas.

2.1 Mecanística da Via dos Pequenos RNAs de Interferência

A produção dos siRNAs é induzida pela presença moléculas precursoras denominadas dsRNAs. Estes, são caracterizados por serem grandes sequências de RNA dupla-fita que possuem complementariedade ao mRNA-alvo, porém podendo ter um tamanho menor que 200 bp em alguns casos, ou de fato chegando até 20.000 bp em outros (FUKUHARA; MORIAYAMA, 2008). Uma vez dentro da célula, estes precursores são reconhecidos pela RNase-3, denominada Dicer-2 (DCR-2), onde são processados até o tamanho de

aproximadamente 21 nucleotídeos, tornando-se um efector de siRNA maduro (NOWOTNY; YANG, 2009; AMARAL; DANSA-PETRETSKI, 2012).

Os dsRNAs podem ter sua origem tanto endógena, quanto exógena. Esta diferenciação induz diferentes braços de reconhecimento molecular, uma vez que possuem caracterizações macromoleculares próprias. Para o reconhecimento endógeno, o dsRNA deve possuir na mesma fita, regiões complementares que se auto dimerizam em conformações secundárias denominadas ‘hairpins’. Estas estruturas são reconhecidas pela DCR-2 e postumamente a um processo de metilação pela quinase HEN1, liga-se ao complexo RISC-dependente-de-siRNA, conferindo especificidade a essa maquinaria. Já o reconhecimento exógeno, os siRNAs são originados a partir de dsRNA compostos por duas fitas complementares, porém independentes, que são provenientes de um segundo organismo ou produzidos *in vitro*. Estes também sofrem a ação da DCR-2 e, após a metilação pela HEN1, os siRNAs formados são conjugados pelo siRISC-dependente-de-siRNA, tornando-os aptos a atingir os transcritos-alvo (KUMAR et al., 2018; O’KEEFE, 2013).

Apesar do complexo siRISC em ambos os casos possuir a enzima Argonata-2 em sua maquinaria, a enzima R3D1 se faz presente apenas para o braço endógeno da via, enquanto a R2D2 ao exógeno (NOWOTNY; YANG, 2009; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). Uma vez com a maquinaria madura, os dois tipos de siRNAs de fita simples *antisense*, acoplados na siRISC apropriada, guiam com especificidade através da complementariedade com a sua sequência precursora de dsRNA, o complexo ao transcrito-alvo, comprometendo de forma parcial e temporária a sua expressão.

Os complexos siRNAs também podem atuar no *feedback* positivo da via, sendo molde de fita simples para produção de mais dsRNA pela RNA polimerase dependente-de-RNA (RdRp) (AMARAL; DANSA-PETRETSKI, 2012; O’KEEFE, 2013).

2.2 Via de siRNA no Controle de Pragas

Como descrito anteriormente, a via de RNAi é um mecanismo biológico natural que regula a expressão gênica por meio da degradação seletiva do RNA mensageiro. Desde que foi descrita por Fire et al. (1998), a utilização da via de RNAi como ferramenta molecular tem quebrado barreiras dentro do campo da genômica funcional.

Esta área do conhecimento se dedica à investigação e caracterização de genes ou vias, através da observação e cruzamento dos efeitos causados por modulações induzidas na expressão genica de espécies de interesse (HEIGWER et al., 2018; SOUZA-NETO et al., 2009; ELLENDORFF et al., 2009; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). A utilização dos efetores da via de siRNA permite não apenas tornar essa abordagem mais específica, como também torna qualquer transcrito conhecido, de uma determinada espécie, um potencial alvo para investigações; sem depender, por exemplo, de estudos longos e muitas vezes imprevisíveis de agentes químicos, que muitas vezes modulam a expressão de forma indireta.

Adicionalmente, nas últimas décadas surgiu um número crescente de estudos que se utilizam desta via para direcionar o silenciamento de genes cruciais ao controle de pragas vegetais e entomológicas (KEBEDE; FITE, 2022; CHRISTIAENS; NIU; TANING, 2020; TOMARI; ZAMORE, 2005; RODRÍGUEZ-CABRERA et al., 2010; RODRÍGUEZ-DE LA NOVAL et al., 2019). O apelo dessa abordagem está diretamente ligado à redução do uso de pesticidas tradicionais, uma vez que traz benefícios em termos de especificidade. Idealmente, o emprego desse método evitaria afetar organismos que não sejam considerados pragas, como agentes polinizadores, espécies nativas sob equilíbrio ecológico, os cultivares de interesse produtivo ou a própria espécie humana. Contribuindo para o desenvolvimento de controle integrado ambientalmente sustentável, funcional e seguro.

Entretanto, a utilização de moléculas de RNA como efetores trazem também enormes desafios. Já que, embora haja um progresso significativo em pesquisas laboratoriais, a aplicação prática no campo ainda exige estudos mais aprofundados que garantam: a eficiência e estabilidade em um ambiente com periódica radiação solar (FLETCHER et al., 2022); uma entrega otimizada das moléculas de RNAi, não apenas para conferir a capacidade de ultrapassar barreiras biológicas como a presença de cutículas, ceras e paredes celulares que impedem a translocação por diferentes tecidos, mas também barreiras bioquímicas do metabolismo da espécie alvo (COOPER et al., 2019; HOANG et al., 2022; GRIEBLER et al., 2008; SONG et. al, 2018); e por fim, ser capaz de avaliar a longo prazo os impactos ambientais, nas propriedades nutricionais das culturas de interesse e consequentemente na saúde humana (RODRIGUES; PETRICK, 2020; NEYUMEIER; MEISTER, 2020).

Em resumo, a criação desse novo método de controle possui muitas vantagens, com expectativas de revolucionar o mercado de produção agrícola, mitigando o ambiente de pressão artificial causado pelo uso indiscriminado de pesticidas. Porém, existem muitos desafios a serem superados, não apenas para chegarmos à aplicação em campo, mas de forma a desenvolver um produto economicamente viável e competitivo em um mercado que culturalmente preza por soluções baratas e a curto-prazo.

3 METODOLOGIA

A sequência de métodos descritos nos tópicos abaixo tem como finalidade realizar o *design*, sintetizar e avaliar a eficiência de silenciamento dos diferentes efetores de RNA para manejo de pragas vegetais e entomológicas.

3.1 Manutenção das Plantas e Insetos

3.1.1 *Spodoptera frugiperda*

Os indivíduos da espécie *Spodoptera frugiperda* foram mantidos sob condições controladas de insetário a temperatura de 25 ± 2 °C, com umidade de $50 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 14h claro/10h escuro.

A lagartas foram individualizadas em instar larval 1 (L1) com aproximadamente 5 mL de dieta artificial a base de feijão e germe de trigo comercial (Pragas.com Ltda.) que supriu as necessidades nutricionais até a coleta dos indivíduos para os ensaios realizados ou até o estágio de pupa para manutenção da colônia.

Para esta última finalidade, as pupas foram transferidas para uma gaiola. Ao emergirem, foi fornecido *ad libitum* aos adultos algodão embebido em sacarose 20% (m/v) em água osmose reversa autoclavada.

Para os ensaios, foram utilizados indivíduos em instar larval 3 (L3). Postumamente, foram mantidos nas mesmas condições controladas de insetário descritas até a coleta em 1, 2 e 4 dias pós-tratamento, seguindo para a extração de RNA (**item 3.4.2**).

3.1.2 *Glycine max*

Para as avaliações envolvendo o silenciamento de plantas, foi utilizada uma espécie modelo para o aguapé (*Eichhornia crassipes*) escolhida a partir de dois parâmetros-base: ter seu transcriptoma disponível e amplamente mapeado na literatura, bem como em bancos de dados; e ser uma espécie de fácil plantio e manejo que já estivesse na rotina da empresa ou dos laboratórios parceiros.

Levando em consideração os parâmetros descritos, a espécie modelo escolhida foi a soja, *Glycine max*. Os indivíduos permaneceram em casa de vegetação desde o seu plantio a 25 $\pm$ 5°C, com 60 $\pm$ 10% de umidade e com fotoperíodo natural. Para os ensaios, foram utilizadas plantas com 20 dias de desenvolvimento. Após, foram mantidas nas mesmas condições descritas até a coleta dos tecidos para a extração de RNA (**item 3.4.1**).

3.2 *Design dos Efetores de RNA*

Os tópicos abaixo descrevem a metodologia *in silico* para o *design* dos siRNAs adquiridos comercialmente (**item 3.2.2**), bem como dos dsRNA que foram sintetizados a partir do RNA extraído de *Spodoptera frugiperda* e *Glycine max*.

Por estes últimos terem um tamanho de sequência acima de 200 bp, não foi possível adquiri-los comercialmente. Desta forma, os efetores de dsRNA foram sintetizados *in vitro* com o auxílio de *primers* que isolaram por PCR a sequência dos diferentes transcritos-alvo. Desta forma, o *design* de obtenção desses *primers* também foi incluído no **item 3.2.1**.

3.2.1 *Primers* para Síntese de dsRNA e Análise de Expressão Gênica

As sequências de transcritos dos diferentes genes-alvo foram submetidas aos *softwares online* Primer3Plus <<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>> e PrimerBLAST <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>> para a obtenção das sequências-candidatas de óligos para a síntese dos dsRNAs e, postumamente, dos óligos para a validar os silenciamentos.

As sequências-candidatas foram avaliadas no *software online* OligoAnalyzer Tool <<https://www.idtdna.com/calc/analyze/>>, para que fosse predita a espontaneidade de formação de homodímeros, heterodímeros e hairpins; fatores que podem diminuir a eficiência da reação de PCR convencional e RT-qPCR.

Por fim, sequências de óligonucleotídeos foram avaliadas no *software online* BLAST <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/blast/>>, onde foi verificada a especificidade das suas sequências não apenas dentro do transcriptoma de *Glycine max* ou *Spodoptera frugiperda*, mas também dentro dos transcritos de *Homo sapiens* e algumas espécies representativas do gênero *Apoidea* no Brasil.

As sequências que apresentaram as melhores características na análise *in silico*, estão dispostas na **Tabela 1** e **Tabela 6**.

3.2.2 Design dos siRNAs

Para o *design* dos siRNAs foi utilizado o *software online BLOCK-iT™ RNAi Designer* <<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/rnaiDesign.jsp>> que além de sugerir sequencias-candidatas, também realiza diversas análises de qualidade, predizendo interações inespecíficas.

Por fim, as sequências-candidatas de siRNA foram avaliadas pelo *software online* BLAST <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/blast/>>, para verificar a especificidade destes óligos dentro dos transcriptomas de *Glycine max* e *Homo sapiens*.

As sequencias dos siRNAs resultantes dessa avaliação estão dispostas na **Tabela 2**.

3.3 Ensaios de Silenciamento

Os ensaios de silenciamento ocorreram através da administração de efetores da via de RNAi capazes de impedir parcialmente e temporariamente a expressão de diferentes gene-alvo.

Para os ensaios que visam o controle de pragas vegetais utilizando como modelo a espécie *Glycine max*, uma vez definidos os genes candidatos e feito o *design in silico* dos diferentes tipos de óligos (**item 3.2**), seguiu-se para a obtenção dos efetores de siRNA e síntese dos dsRNAs (**item 3.3.1**), e postumamente à aplicação destas moléculas em dois ensaios distintos (**Figura 1**).

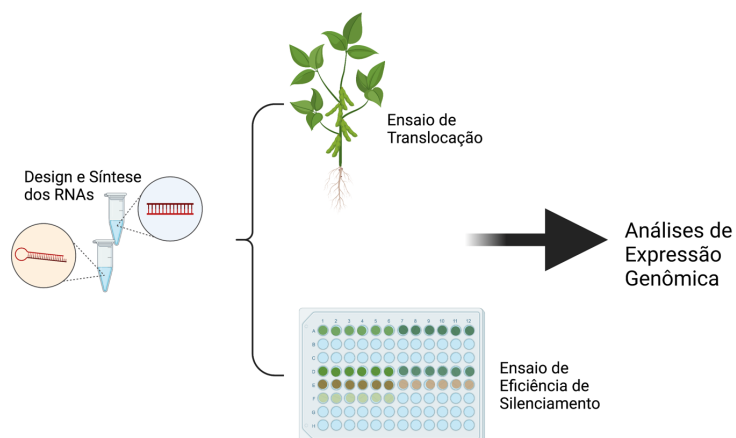


Figura 1. Apresentação esquemática das metodologias utilizadas durante esta pesquisa para avaliação da translocação do dsRNA-inerte e de potenciais efetores de RNA para o controle de pragas vegetais utilizando *Glycine max* como modelo.

O primeiro ensaio, intitulado como ‘Ensaio de Translocação’ (**Figura 1**), utilizou uma sequência de dsRNA que é inerte à soja (**item 3.3.4**), ou seja, que não é capaz de modular transcritos nesta espécie. A intenção foi avaliar se esta molécula sofre absorção foliar e translocação para outros tecidos utilizando *primers* internos à sua sequência, uma vez que este RNA-efetor é passível à detecção qualitativa. Evitando assim, a amplificação conjunta de transcritos da planta.

O segundo, intitulado como ‘Ensaio de Eficiência de Silenciamento’ (**Figura 1**), utilizou discos de folha embebidos em diferentes tipos de soluções-efetoras de RNA (dsRNA ou siRNA), garantindo desta forma, a absorção pelo tecido. Neste ensaio a proposta foi avaliar a dinâmica de modulação dos transcritos na tentativa de silenciar os genes-alvo.

Já para os ensaios que visam o silenciamento da lagarta *Spodoptera frugiperda* (**Figura 2**) uma vez definidos os gene-alvos SfA1, SfA2, SfA3, SfA4 e SfA5, foram: realizados os *designs in silico* (**item 3.2.1**); feitas as sínteses das sequências de dsRNA (**item 3.3.1**); microinjetadas as lagartas com os RNAs-efetores (**item 3.3.3**); e por fim, efetuadas as análises de modulação de expressão por RT-qPCR (**item 3.7**).

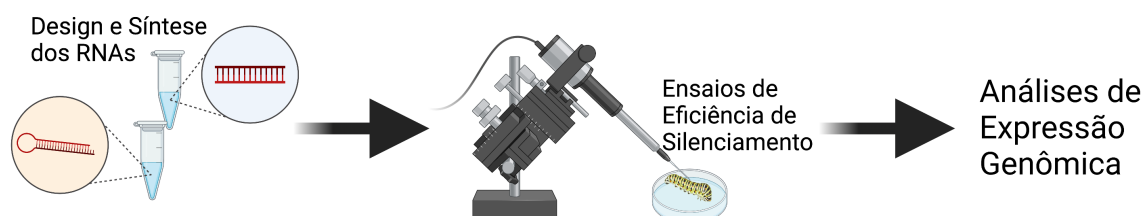


Figura 2. Apresentação esquemática das metodologias utilizadas durante este projeto para avaliação dos potenciais efetores de dsRNA para controle de *Spodoptera frugiperda*.

3.3.1 Obtenção dos Efetores de RNA

Os dsRNAs utilizados no silenciamento foram sintetizados *in vitro* a partir do produto amplificado, ou *template*, dos diferentes genes-alvos. Para isso, foram utilizados os *primers* contidos na **Tabela 1** e **Tabela 6**. Para estes *primers*, foi adicionada uma região adaptadora do promotor T7 (5'- TAATACGACTCACTATAGGGG- 3') *upstream* à sequência específica do oligonucleotídeo, uma vez que ela se faz necessária para o reconhecimento da enzima transcriptase utilizada durante esta síntese. Os *primers* foram adquiridos comercialmente pela empresa Invitrogen Ltda. e foram eluídos em água ultra-pura para uma concentração estoque de 100 µM.

As condições do termociclador para geração dos *templates* de cDNA para posterior síntese de dsRNA foram de: 94 °C por 5 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 56-62 °C por 30 segundos e 72 °C por 40 segundos; e 72 °C por 7 minutos.

Por fim, a transcrição *in vitro* foi realizada com o kit *HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis* (New England BioLabs) de acordo com as recomendações do fabricante.

Já para os siRNAs, uma vez feito o *design* das sequências (**item 3.2.2**) os siRNAs foram adquiridos comercialmente pela empresa Invitrogen Ltda., e postumamente ressuspensos em água ultra-pura para uma concentração estoque de 100 µM.

3.3.2 Purificação e Ajustes de Concentração dos RNAs

A precipitação dos siRNAs e dos dsRNAs foi realizada adicionando 0,1 (v/v) de acetato de sódio 7,5 M e 2,5 (v/v) de etanol absoluto, seguido de uma centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. Após, ocorreram, a lavagem com 500 µL de etanol 75%, outra centrifugação com os mesmos parâmetros e ressuspensão em 30 µL de água ultrapura.

Por fim, as concentrações dos RNAs foram aferidas pelo espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Uniscience). Para os ensaios em disco de folha de *Glycyne max* a concentração dos RNAs foi ajustada para 15 ppm, enquanto para os ensaios de translocação em plantas os dsRNAs foi ajustada para 25 ng/μL. Já para os ensaios de silenciamento em *Spodoptera frugiperda*, os dsRNAs foram ajustados para 13 μg/μL.

Uma vez na concentração de uso, os diferentes efetores de RNAs foram armazenados em *freezer* -80°C.

3.3.3 Ensaio de Silenciamento em Insetos

As microinjeções foram realizadas a partir de uma adaptação da metodologia descrita por Rodríguez–Cabrera et al. (2010) utilizando o Nanoject II (Drummont Scientific) com capilares de vidro.

Os indivíduos inicialmente no terceiro instar larval (L3) foram primeiramente anestesiados em um *cooler* a -4 °C. Após, foram microinjetados no penúltimo seguimento de pernas abdominais com aproximadamente 380 nL de dsRNA na concentração de 13 μg/μL para o gene-alvo SfA2 e para BtC1, o controle negativo.

Os 456 insetos microinjetados foram coletados ao longo de 1, 2 e 4 dias pós-microinjeção em um total de 6 réplicas biológicas independentes. Gerando 36 *pools* de 6 a 8 lagartas por condição experimental. Durante a coleta, as lagartas variaram entre o terceiro instar larva (L3) nas coletas com menor tempo de exposição, chegando até o sexto instar larval (L6) nas coletas mais tardias.

Os indivíduos dos *pools* foram agrupados em microtubos de 2 mL contendo inicialmente 300 µL de TRIzol (Ambion®) e 5 *beads* de vidro de 2,4 mm de diâmetro. Após, o material bruto foi extraído com o homogeneizador BeadBlaster™ 24 (Benchmark).

Alguns *pools* foram particionados durante a extração devido ao tamanho das lagartas em instares tardios (L5 e L6). Para estes, o material extraído foi postumamente unificado. De cada *pool*, foram aliquoteados 300 µL de material bruto extraído e adicionados mais 200µL de TRIzol (Ambion®) em um total de 500µL para cada tubo. Estes, foram armazenadas em um *freezer* -80 °C até o momento da extração de RNA total (**item 3.4.2**), e por fim, à posterior análise de expressão relativa por PCR em tempo real (RT-qPCR) utilizando o equipamento QuantStudio 3 (Applied Biosystems) (**item 3.7**).

3.3.4 Ensaio de Silenciamento em Discos de Folha

Os genes-alvo foram GmA1 e GmA2, enquanto para o controle foi utilizado um gene que não se faz presente no genoma de plantas, AaC1(*Aedes aegypti*). A concentração do ensaio foi definida para 15 ppm, para tal, os diferentes RNAs-efetores para silenciamento, os siRNAs e os dsRNAs, foram ajustados em água ultra-pura a partir de sua concentração estoque de 100 µM e 13 µg/µL respectivamente.

Discos de folhas com área superficial de 1,56 cm² (Ø=1) foram embebidos em 300 µL das diferentes soluções de RNA a 15 ppm em uma placa de 48 poços. Cada condição experimental teve 6 repetições para cada tempo de análise de 1 e 2 dias (**Figura 3**). Durante este período, os discos de folha permaneceram nas condições de casa de vegetação descritas no **item 3.1.2**.

Ao fim, foram definidos 9 grupos experimentais, dos quais foram 8 efetores: um único dsRNA para GmA1, nomeado como GmA1-dsRNA; três siRNAs para GmA1, nomeados como

GmA1-siRNA1136, GmA1-siRNA914 e GmA1-siRNA469; um único dsRNA para GmA2, nomeado como GmA2-dsRNA; e três siRNAs para GmA2, nomeados como GmA2-siRNA131, GmA2-siRNA1924 e GmA2-siRNA798. Além, da solução com dsRNA-inerte para *Glycine max* como gupo controle, o dsRNA para AaC1 (AaC1-dsRNA).

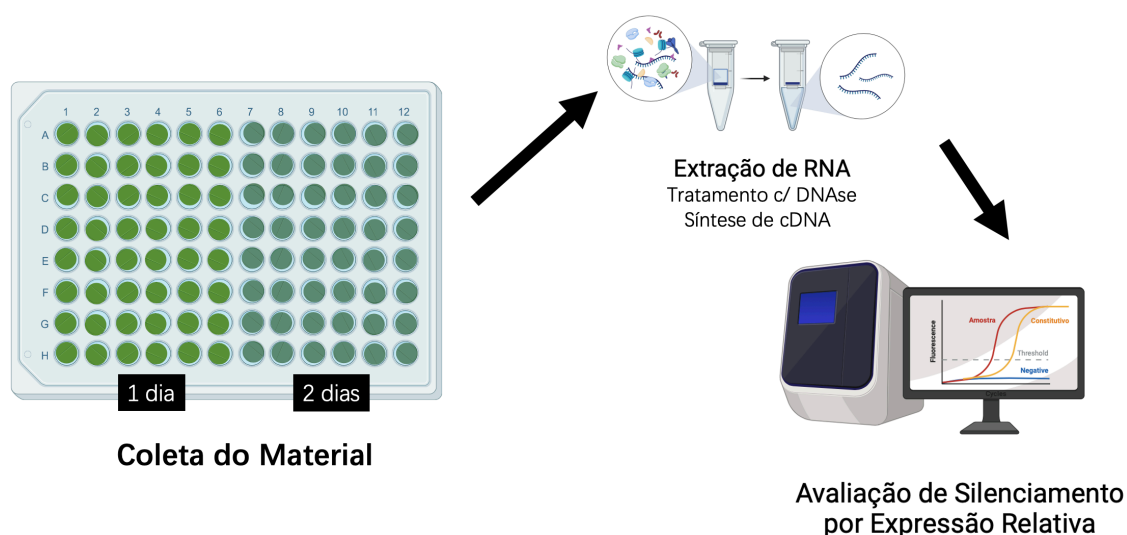


Figura 3. Resumo esquemático da metodologia utilizada para o ensaio avaliação de silenciamento de *Glycine max*. Apresentando os tempos de coleta dos discos de folha e o processamento das amostras até a validação do silenciamento por RT-qPCR.

Para coleta das amostras, cada disco de folha foi armazenado em *freezer* -80°C até a extração (item 3.4.1) e posterior análise de expressão relativa por RT-qPCR (Figura 3) utilizando o equipamento QuantStudio 3 (Applied Biosystems) (item 3.7).

3.3.5 Ensaio de Translocação em Plantas

Nesse ensaio foram utilizadas plantas da espécie *Glycine max* como espécie modelo com aproximadamente 20 dias de crescimento. Durante todo o ensaio, as plantas permaneceram em casa de vegetação sob condições descritas no item 3.1.2.

Para avaliar a translocação do dsRNA ao longo de diferentes tecidos de plantas, foi escolhida uma sequência de dsRNA-inerte, isto é, uma a qual não há ocorrência na espécie

modelo, do gene AaC2 (*Aedes aegypti*). Desta forma, esta molécula de inerte de AaC2-dsRNA é passível de detecção por PCR qualitativa, utilizando *primers* internos ao próprio dsRNA fornecido, não havendo preocupação com a amplificação conjunta de transcritos da planta.

Para estipular uma concentração de aplicação foi considerada a faixa de massa por área de plantio de 2-10 g/ha diluída em 200 L/ha, relações comumente utilizadas em de testes de potenciais herbicidas, resultando no valor aplicável de 25-35 ng/μL.

Uma vez determinada a faixa de concentração para aplicação, foi realizada a síntese e a solução de AaC2-dsRNA foi ajustada para 25 ng/μL e acrescida do agente surfactante Assist® EC (BASF) a 0,2% (v/v).

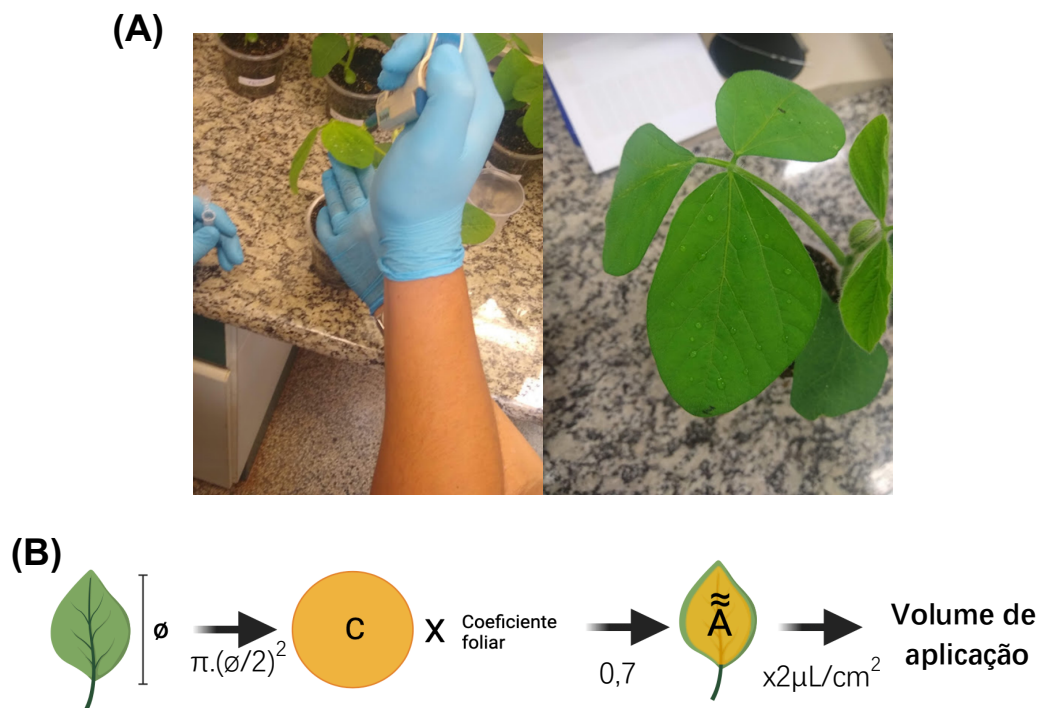


Figura 4. Microaplicação das soluções de dsRNA-inerte na superfície foliar de *Glycine max*. (A) Fotos durante e após a microaplicação com micropipeta. (B) Representação esquemática que apresenta como foi deduzido o volume de aplicação de solução de RNA-inerte para cada folha aplicada, onde: $\varnothing$ = diâmetro; C = área foliar não-ajustada; e $A \approx$ = área foliar ajustada.

A microaplicação foi realizada com o auxílio de uma micropipeta com precisão entre 2 e 20 µL diretamente na superfície das folhas dos trifólios mais jovens (**Figura 4A**), sendo o volume variável de acordo com a área foliar (**Figura 4B**), podendo ser consultado na **Tabela 5**. Aproximadamente 2 µL/cm² de solução efetora foi aplicada em 2 folhas de cada um dos 5 indivíduos da espécie-modelo, considerados como réplicas biológicas independentes.

Os diferentes tecidos foram coletados manualmente em 1 dia e 7 dias após a microaplicação. Foram estes: folhas aplicadas; folhas não aplicadas; caule; e raiz (**Figura 5**).

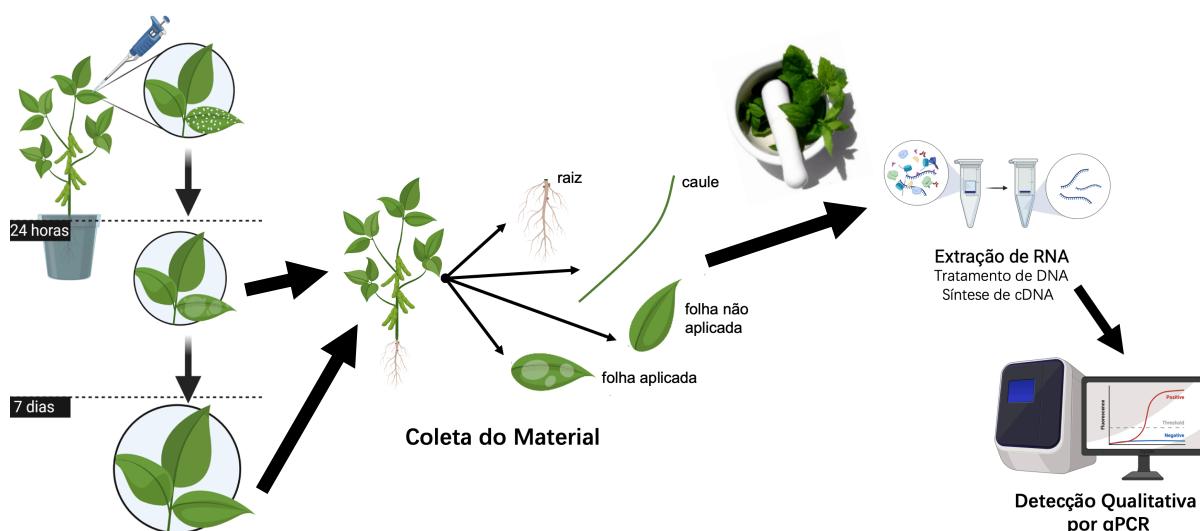


Figura 5. Resumo esquemático da metodologia utilizada para o ensaio de translocação em plantas. Apresentando: os tempos de coleta; os diferentes tecidos segmentados; e o processamento das amostras até a detecção do RNA-inerte em *Glycine max*.

Após as devidas etapas de extração (**item 3.4.1**), tratamento com DNase (**item 3.4.3**) e síntese de cDNA (**item 3.5**), a avaliação qualitativa da presença do dsRNA foi realizada por PCR em tempo real (**Figura 5**) utilizando o equipamento QuantStudio 3 (Applied Biosystems) para garantir que concentrações mais baixas de dsRNA fossem detectadas (**item 3.7**).

3.4 Extração de RNA Total

3.4.1 Extração de RNA de Plantas

Os diferentes tecidos coletados no ensaio de translocação de dsRNA em plantas (**item 3.3.5**), foram mergulhados em nitrogênio líquido e foram macerados com ajuda de um gral com pistilo. De cada tecido macerado, foi pesado 100 µg em balança analítica solubilizado em 450 µL de tampão de lise RLT do *kit RNeasy® Plant Mini* (QIAGEN).

Para as amostras do ensaio de silenciamento (**item 3.3.4**), os discos de folha foram mergulhados em nitrogênio líquido, embebidos em 450 µL de tampão de lise RLT do *kit RNeasy® Plant Mini* (QIAGEN) juntamente com 6 *beads* de cerâmica em um tubo cônico de 5 mL. O material foi macerado com o uso do extrusor Bead Mill Homogenizer (Omni International) durante 10 segundos em velocidade de 5 m/s. Após, cada tubo foi centrifugado a 2000 rpm durante 40 segundos à temperatura ambiente e os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de 1,5 mL.

Para ambos os casos, seguiu-se para a extração de RNA utilizando o *kit RNeasy® Plant Mini* (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. Este *kit* possui um sistema de colunas tanto para a precipitação, quanto para lavagem e purificação do material. Ao fim, foi feita uma eluição em 30 µL de água ultra-pura.

As amostras de RNA extraídas tiveram suas concentrações aferidas pelo espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Uniscience) e foram armazenadas em *freezer* -80 °C.

3.4.2 Extração de RNA de Insetos

Microtubos de 2 mL com tecido macerado de insetos previamente armazenados em 500 µL de TRIzol foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C.

Após a fase líquida ser transferida para um novo tubo, os materiais dos tubos receberam 100 µL de clorofórmio, foram agitados vigorosamente por inversão, incubados por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C.

Da separação bifásica (aquosa-orgânica) obtida, a fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, de forma a evitar o carregamento de DNA genômico, que se encontra na interfase.

Ao material do novo tubo foi adicionado 250 µL de isopropanol, o RNA foi precipitado por 3 minutos à temperatura ambiente e a precipitação destes ácidos nucleicos foi feita por centrifugação a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C. O precipitado foi duas vezes lavado com 500 µL de etanol 75% a -20 °C. A cada lavagem, o material foi agitado com auxílio de um vórtex e centrifugado a 7.500 rpm por 5 min a 4 °C. Ao final, o *pellet* formado foi seco à temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos e solubilizado em 30 µL de água ultrapura.

As amostras tiveram suas concentrações aferidas pelo espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Uniscience) e por fim, armazenadas em *freezer* -80°C.

3.4.3 Tratamento com DNase

Do RNA extraído de cada amostra, foi tratado 1µg para plantas ou 1,36 µg para insetos com o *kit DNase I Solution, Rnase-Free* (Thermo Fisher Scientific). O tratamento com DNase garante que não haja DNA genômico entre o RNA extraído. Para isso, as amostras foram incubadas por 2 horas a 37 °C. Seguido pela adição de 1µL de EDTA a 6 mM, que age como um agente quelante da reação, que conjuntamente com uma incubação de 85 °C por 10 minutos impedem que a DNase I aja durante ou após a síntese de cDNA.

3.5 Síntese de DNA Complementar

As sequências de DNA complementar (cDNA) foram sintetizadas a partir dos RNAs extraídos e tratados anteriormente (**item 3.4**), portanto, representam a dinâmica de transcrições de cada amostra, podendo, dessa forma, serem utilizadas para as análises de expressão gênica qualitativa ou quantitativa.

3.5.1 Síntese de DNA Complementar para Plantas

A síntese foi realizada com a utilização do *kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Fisher Scientific). Para 11 μL de RNA tratado com DNase I na concentração aproximada de $1\mu\text{g}$, foi adicionado: 1 μL de óligos hexameros a $10\mu\text{M}$; 2 μL de dNTP a 10mM ; 1 μL de enzima transcriptase a $200\text{U}/\mu\text{L}$; 1 μL de inibidor de RNase a $20\text{ U}/\mu\text{L}$; e 4 μL de solução tampão com os demais reagentes. Totalizando 20 μL de reação.

As condições de termociclador foram: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos; $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1,5 horas; e $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Após sintetizados, os cDNAs de cada *pool* foram diluídos na proporção 1:10 (v/v) em água-ultrapura e foram armazenados em *freezer* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.2 Síntese de DNA Complementar para Insetos

A síntese foi realizada com a utilização do *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific) adaptado para a utilização de oligonucleotídeos específicos para transcritos. Para 11 μL de RNA tratado com DNase na concentração aproximada de $1,36\mu\text{g}$, foi adicionado: 2 μL de *Oligo(dT)18 Primer* (Thermo Scientific™) a $500\text{ ng}/\mu\text{L}$; 0,8 μL de dNTP a 100mM ; 1 μL de enzima transcriptase a $200\text{U}/\mu\text{L}$; 1 μL de inibidor de RNase a $20\text{ U}/\mu\text{L}$; 2,2 μL de água ultra-pura; e 2 μL de solução tampão com os demais reagentes.

As condições de termociclador foram: 42 °C por 2 horas; e 85 °C por 10 minutos. Após sintetizados, os cDNAs de cada *pool* foram diluídos na proporção 1:10 (v/v) em água-ultrapura e foram armazenados em *freezer* a -20 °C.

3.6 Análise de Eficiência de Reação

O método de Pfaffl (PFAFFL, 2001) foi utilizado para calcular a expressão relativa dos diferentes alvos. Para tal, foi necessário primeiramente definir a eficiência de reação (E) dos *primers* utilizados. Para obter o valor de E é utilizada a **Fórmula 1**.

$$E (\%) = \left(10^{\frac{-1}{Slope}} - 1 \right) \times 100$$

Fórmula 1. Cálculo para deduzir o valor de eficiência de reação um determinado par de *primers*. Onde E é o valor de eficiência; e *Slope* é o coeficiente angular da equação da reta formada a partir dos valores de CT.

Para obter os valores de E, portanto, é necessário antes determinar o valor de *Slope* de cada par de *primers*. Este, por sua vez, é obtido por meio de uma série de reações de RT-qPCR utilizando o mesmo par de *primers* em uma concentração fixa (**Tabela 3**), porém, cujo o *template* de cDNA de concentração conhecida tenha sido diluído de forma seriada (v/v) a partir de um determinado fator de diluição, como apresentado na **Figura 6A**.

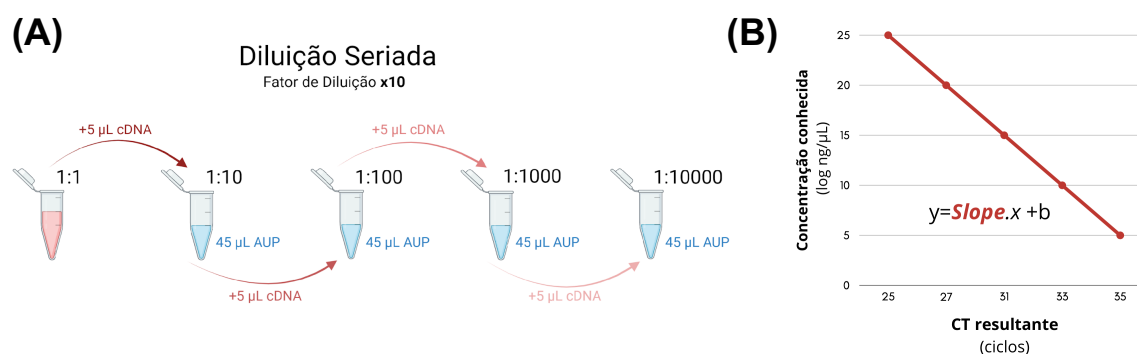


Figura 6. Esquemas de eficiência de reação. **(A)** Exemplo de diluição seriada de cDNA para um fator de diluição 10 (v/v) e volume útil de 45 µL para cada concentração. **(B)** Exemplo de obtenção do valor de *Slope* de um par de *primers* fictício.

Ao fim das reações de RT-qPCR, os dados gerados são dispostos em um gráfico contendo valores de ‘CT resultantes’ no eixo X, pelos valores linearizados das ‘Concentrações conhecidas’ de cDNA no eixo Y. Os CTs, então, são distribuídos conforme sua concentração esperada e os pontos gerados sofrem uma interpolação linear para que os valores de *Slope* de cada par de *primers* sejam obtidos (**Figura 6B**). Posteriormente, os *Slopes* são aplicados na **Fórmula 1** para se deduzir os seus respectivos valores de E (**Tabela 3 e Tabela 7**).

3.7 Avaliação de Expressão Relativa por RT-qPCR

3.7.1 Preparação em Bancada

As análises de expressão relativa foram realizadas utilizando o equipamento QuantStudio 3 (Applied Biosystems) com o *kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix for qPCR* (Thermo Fisher Scientific). Para cada reação, foram utilizados: 7,5 µL de *SYBR Green PCR Master Mix*; 4,5 µL dos diferentes templates de cDNA; 3 µL de par de primer a 2,5 µM para tecido vegetal; ou 1,3 µL de par de *primer* a 10 µM com 1,7 µL de água ultra-pura para insetos. Totalizando 15 µL de reação por amostra.

As condições do equipamento foram de: um ciclo inicial de pré-desnaturação de 10 minutos a 95 °C; seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos para desnaturação e de 56 °C a 60 °C por 1 minuto para anelamento e extensão; seguidos por uma análise de curva de *melting* para monitoramento de amplificações inespecíficas ou interações entre os *primers*.

3.7.2 Processamento de Dados

Para a avaliação dos dados brutos de expressão relativa, os CTs, foi empregado o método de Pfaffl (PFAFFL, 2001). Este método matemático, conforme apresentado na **Fórmula 2**, retrata uma generalização do método de Livak (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), ambos se

propõem a apresentar uma avaliação comparativa de expressão, chamada *Fold Change*, entre o grupo tratado e o grupo controle.

$$Fold\ Change = \frac{E^{\Delta CT_{tratamento}}}{E^{\Delta CT_{constitutivo}}}$$

Fórmula 2. Cálculo de expressão relativa pelo método de Pfaffl para obter os valores de *Fold Change* de cada amostra.

Observando a **Fórmula 2**, para obter os valores de *Fold Change*, utiliza-se os valores de E deduzidos nos cálculos de eficiência de reação de cada par de *primers* para ‘Expressão Relativa’ apresentado no **item 3.6**. O $\Delta CT_{tratamento}$ é calculado a partir da diferença entre os CTs do grupo controle (dsRNA para AaC1 de *Aedes aegypti*, AaC1-dsRNA; ou BtC1 de *Bacillus thuringiensis*, BtC1-dsRNA), com os CTs das amostras tratadas com as soluções-efetoras de RNA de interferência. Já o $\Delta CT_{constitutivo}$, refere-se a uma normalização da expressão relativa utilizando genes constitutivos específicos de cada espécie, dessa forma, tornando as amostras comparáveis independente das diferenças de quantidade de material genético bruto inicial (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001; MA et al., 2013).

Para *Glycine max*, foi utilizado o transcrito do gene Actina 7 (GmHK1) como endógeno constitutivo (MA et al., 2013). Enquanto para *Spodoptera frugiperda* foi escolhido o transcrito para GAPDH (SfKH2) descrito por Han et al. (2021) (**Tabela 1 e Tabela 6**).

3.8 Análise Qualitativa por RT-qPCR

A avaliação qualitativa foi empregada para detectar a presença de um dsRNA-inerte (AaC2 de *Aedes aegypti*, AaC2-dsRNA) para os ensaios de translocação em soja, justamente para investigar a entrada e fluxo do dsRNA exógeno em diferentes tecidos da planta. Esta

avaliação foi realizada por RT-qPCR para garantir que concentrações mais baixas do dsRNA fossem detectadas.

O equipamento utilizado para a análise foi o QuantStudio 3 (Applied Biosystems) com o kit *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X* (Thermo Fisher Scientific). Para cada reação foram utilizados 7,5 µL de *SYBR Green PCR Master Mix*, 3 µL de *primers* a 2,5 µM internos à sequência de AaC2-dsRNA e 4,5 µL de cDNA de cada amostra. As condições do equipamento foram de: um ciclo inicial de 10 min a 95 °C; seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 58 °C por 1 minuto para todas as reações.

Os valores de CT obtidos pela RT-qPCR foram normalizados utilizando uma relação simples de ΔCT ($CT_{\text{constitutivo}} - CT_{\text{RNA-inerte}}$), utilizando os dados de expressão do gene constitutivo GmHK1.

4 RESULTADOS

Os tópicos a seguir apresentam os resultados dos ensaios experimentais em pragas vegetais e entomológicas descritos na metodologia (**item 3**) na intenção de atender os objetivos desta dissertação. Para facilitar o entendimento dos resultados obtidos, estes, foram agrupados entre *Glycine max* (soja) ou *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho-de-milho).

4.1 Resultados para *Glycine max*

Primeiramente são apresentadas as sequencias de óligos relacionados aos efetores de RNA e suas avaliações de eficiência. Após, os resultados referentes a translocação dos RNAs em *Glycine max*. Por fim, são expostos os resultados de eficiência de silenciamento para transcritos dos genes GmA1 e GmA2 para *Glycine max*.

4.1.1 Efetores de RNA para *Glycine max*

Os resultados deste tópico apresentam as sequencias de *primers* precursores dos dsRNA; as sequencias de *primers* utilizados para avaliação da eficiência do silenciamento; e ao fim, as sequencias dos diferentes siRNAs (**item 4.1.1.1**). Além disso, também são dispostas as localizações de cada um destes elementos em mapas para cada transcrito-alvo (**item 4.1.1.2**).

4.1.1.1 Óligos Relacionados com o Silenciamento de *Glycine max*

Na **Tabela 1** estão expostas as sequências de *primers* para *Glycine max* cujo *design* passou por todas as etapas descritas no **item 3.2.1**. Os *primers* identificados como ‘Síntese de dsRNA’ foram utilizados para isolar as regiões de interesse dos transcritos (**item 3.3.1**) para posterior síntese dos dsRNA. As sequências em negrito compõem a região promotora T7 que ancora a enzima transcriptase, responsável pela síntese.

Já os *primers* identificados como ‘Expressão Relativa’ foram utilizados para avaliar, por RT-qPCR, as eficiências dos silenciamentos induzidos pelos efetores de RNA para GmA1 e GmA2.

Nome	Alvo	Função	Sequencia (5'-3')
GmA1-dsRNA-F	GmA1	Síntese de dsRNA	DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA1-dsRNA-R			DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA1-qPCR-F	GmA1	Expressão Relativa	DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA1-qPCR-R			DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA2-dsRNA-F	GmA2	Síntese de dsRNA	DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA2-dsRNA-R			DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA2-qPCR-F	GmA2	Expressão Relativa	DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA2-qPCR-R			DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA2-qPCR-F2			DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA2-qPCR-R2			DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
AaC1-dsRNA-F	AaC1	Síntese de dsRNA (Controle negativo)	TAATACGACTCACTATAGGGG CACAATCTGGTCGGCAAG
AaC1-dsRNA-R			TAATACGACTCACTATAGGGG GTATGCTGGAACCTGCGCG
GmHK1-qPCR-F	Actina 7	Expressão Relativa (Constitutivo)	ATTTTGACTGAGCGTGGTTATTCC
GmHK1-qPCR-R			GCTGGTCCTGGCTGTCTCC

Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos complementares aos transcritos de GmA1 e GmA2 em *Glycine max* para síntese de dsRNA e expressão relativa, bem como as sequências de *primers* para o gene constitutivo (Actina 7) e para a síntese do dsRNA para o grupo controle (AaC1 – *Aedes aegypti*).

Na **Tabela 2** estão expostas as sequências dos efetores de siRNAs de GmA1 e GmA2 cujo os *design* passaram pelas etapas descritas pelo **item 3.2.2**.

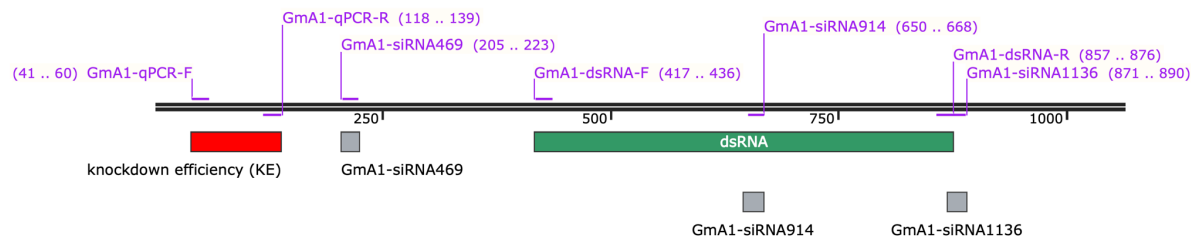
Nome	Alvo	Função	Sequencia (5'-3')
GmA1-siRNA469- S	GmA1	siRNA	DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA1-siRNA469- AS			DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA1-siRNA914- S	GmA1	siRNA	DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA1-siRNA914- AS			DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA1-siRNA1136- S	GmA1	siRNA	DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA1-siRNA1136- AS			DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA2-siRNA131- S	GmA2	siRNA	DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA2-siRNA131- AS			DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA2-siRNA789- S	GmA2	siRNA	DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA2-siRNA789- AS			DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA2-siRNA1924- S	GmA2	siRNA	DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
GmA2-siRNA1924- AS			DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL

Tabela 2. Sequências de siRNA para o silenciamento de GmA1 e GmA2 em *Glycine max*. A identificação em negrito ao final do nome das sequências indica o sentido da fita, sendo S para *sense* e AS para *anti-sense*.

4.1.1.2 Alvos e Localização dos Óligos Relacionados com o Silenciamento de *Glycine max*

GmA1 é uma ciclase essencial para o sistema fotossintético. Esse gene é altamente conservado entre plantas, além de já ser a molécula-alvo de diversos herbicidas da classe de inibidores de fotossíntese, justamente por ser imprescindível à sobrevivência das plantas.

O mapa da **Figura 7** apresenta a localização dos diferentes efetores de RNA e *primers* dentro da sequência do transcrito responsável pela expressão de GmA1.

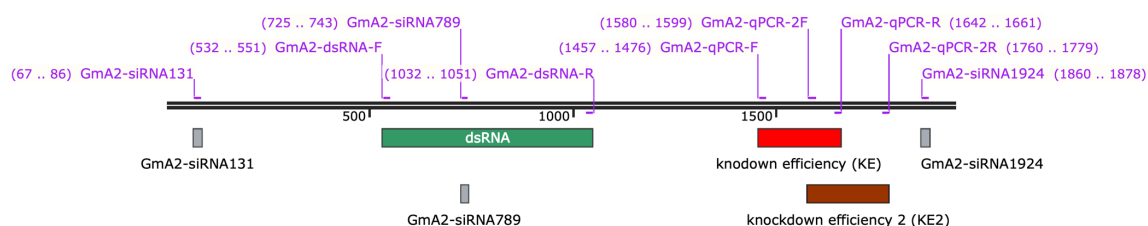


GmA1 - Glycine max

Figura 7. Mapa com a localização dos diferentes óligos utilizados para o silenciamento e detecção dos transcritos de GmA1 em *Glycine max*. As linhas em preto representam a sequência do transcrito, enquanto os elementos: Verde= dsRNA; Cinza= siRNAs; Vermelho= *amplicon* para expressão relativa; Roxo= *primers*.

GmA2 é uma proteína essencial para vias de biossíntese de aminoácidos alifáticos de cadeia ramificada como valina, leucina e isoleucina. Este é outro alvo-molecular de diversas classes de defensivos agrícolas de comum aplicação, justamente pelo potencial de modulação de toda a homeostase da planta.

O mapa da **Figura 8** apresenta a localização dos diferentes efetores de RNA e *primers* dentro da sequência do transcrito de GmA2.



GmA2 - Glycine max

Figura 8. Mapa com a localização dos diferentes óligos utilizados para o silenciamento e detecção dos transcritos de GmA2 em *Glycine max*. As linhas em preto representam a sequência do transcrito, enquanto os elementos: Verde= dsRNA; Cinza= siRNAs; Vermelho ou Marrom= *amplicons* para expressão relativa; Roxo= *primers*.

4.1.2 Eficiência de Reação para Expressão Relativa em *Glycine max*

A **Tabela 3** apresenta valores otimizados para os *primers*, relacionados a: concentração ótima de reação (**Conc.**); temperatura de anelamento (**TA**); coeficiente **Slope** resultante; e valores de eficiência de reação (**E**) deduzidos através da **Fórmula 1**.

Nome	Espécie	Alvo	Conc.	TA	Slope	E (u.a.)	E (%)	R ²
GmA1-qPCR	<i>Glycine max</i>	GmA1	500 µM	59 °C	-3,33	2,00	99,6%	1,00
GmA2-qPCR		GmA2	500 µM	58 °C	-3,55	1,91	91,2%	1,00
GmA2-qPCR-2		GmA2	500 µM	60 °C	-3,93	1,80	79,6%	0,91
GmHK1-qPCR		Actina 7	500 µM	60 °C	-3,50	1,93	93,2%	1,00

Tabela 3. Valores deduzidos ao longo da avaliação de eficiência de reação para cada par de *primers* utilizados para avaliar a expressão relativa de GmA1 e GmA2, bem como do constitutivo Actina 7 em *Glycine max*.

4.1.3 Análise da Translocação de dsRNA em *Glycine max*

Para avaliar se houve translocação do dsRNA-inerte das folhas aplicadas para outros tecidos, foi avaliada a presença desta molécula por RT-qPCR em folhas não aplicadas, caules e raízes em 1 e 7 dias após a microaplicação.

Para tanto, o transcrito do gene AaC2, de ocorrência exclusiva em animais, foi escolhido como base para o *design* do dsRNA-inerte (**Tabela 4**). Desta forma, esta molécula é passível de detecção qualitativa, utilizando *primers* internos ao dsRNA para AaC2 (AaC2-dsRNA).

Nome	Alvo	Função	Sequência (5'-3')
AaC2-dsRNA-F	AaC2	Síntese de dsRNA (RNA-inerte)	TAATACGACTCACTATAGGGCAAGATTCGGTGTTCGCTG
AaC2-dsRNA-R			TAATACGACTCACTATAGGGCCCAGTCCTGCCAGATTCT
AaC2-qPCR-F	AaC2	Detecção Qualitativa	TGGAATCTGTATCGCCCGTG
AaC2-qPCR-R			CGATCGGACTCGACTGGATG

Tabela 4. Sequências de *primers* para AaC2 de *Aedes aegypti* utilizados na síntese de dsRNA e na detecção qualitativa do próprio dsRNA por RT-qPCR.

A microaplicação foi realizada em 5 plantas distintas de *Glycine max* com 20 dias desenvolvimento. Em cada planta, foi aplicada a solução efetora com dsRNA-inerte (AaC2-dsRNA) diretamente na superfície de duas folhas independentes de trifólios jovens com volume proporcional a área foliar, mantendo a relação de 2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de solução efetora, como apresentado na **Tabela 5**.

1 dia pós-aplicação	Amostra	Comprimento (cm)	Altura (cm)	Área (cm ²)	Volume (μL)
	Réplica 1				
	Folha 1	7,3	4,80	24,53	49,06
	Folha 2	7,5	4,60	24,15	48,30
	Réplica 2				
	Folha 1	7,60	4,40	23,41	46,82
	Folha 2	7,50	4,90	25,73	51,45
	Réplica 3				
	Folha 1	6,50	4,20	19,11	38,22
	Folha 2	6,10	4,20	17,93	35,87
	Réplica 4				
	Folha 1	8,90	6,10	38,00	76,01
	Folha 2	7,00	4,60	22,54	45,08
	Réplica 5				
	Folha 1	6,90	4,50	21,74	43,47
	Folha 2	6,80	4,60	21,90	43,79
7 dias pós-aplicação	Amostra	Comprimento (cm)	Altura (cm)	Área (cm ²)	Volume (μL)
	Réplica 1				
	Folha 1	7,20	4,80	24,19	48,38
	Folha 2	6,30	4,20	18,52	37,04
	Réplica 2				
	Folha 1	7,20	5,20	26,21	52,42
	Folha 2	6,80	4,80	22,85	45,70
	Réplica 3				
	Folha 1	7,70	5,60	30,18	60,37
	Folha 2	5,80	4,00	16,24	32,48
	Réplica 4				
	Folha 1	9,00	6,100	38,43	76,86
	Folha 2	6,50	5,500	25,03	50,05
	Réplica 5				
	Folha 1	9,80	6,10	41,85	83,69
	Folha 2	6,40	4,50	20,16	40,32

Tabela 5. Dimensões foliares e o consequente volume de solução efetora com dsRNA-inerte aplicado. O coeficiente de ajuste da área foliar foi de 0,7.

A partir dos valores de CT obtidos pela RT-qPCR, foi determinado um valor normalizado de ΔCT simples para cada amostra. Para tal, foram obtidos concomitantemente os valores de CT da expressão do gene constitutivo Actina 7, resultando na **Figura 9**.

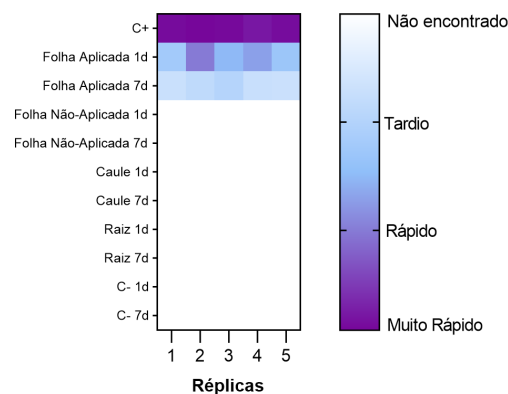


Figura 9. Dados de detecção do AaC2-dsRNA em diferentes tecidos. Para o controle positivo (C+) foi utilizado uma solução do dsRNA a 25 ng/uL como *template* na reação de RT-qPCR. Enquanto para os controles negativos (C-) foi microaplicado 46µL água osmose reversa autoclavada com adição de Assist® EC (BASF) a 0,2% (v/v) nas superfícies foliares.

Observando os resultados qualitativos apresentados na **Figura 9**, fica evidente que o AaC2-dsRNA só foi detectado na folha aplicada. A partir dessa observação, são sugeridas duas possíveis explicações: (1) as moléculas de RNA foram absorvidas pela superfície da folha e, portanto, uma vez absorvidas, não seriam capazes de se translocar célula-a-célula ao ponto de atingir outros tecidos; (2) não houve absorção do RNAs, o que indicaria que a detecção do dsRNA-inerte se trata da própria solução que nunca saiu da superfície da folha aplicada.

4.1.4 Silenciamento em *Glycine max*

Para validar o silenciamento induzido pelos efetores de RNA de *Glycine max*, foram medidas as expressões de GmA1 e GmA2 em discos de folhas durante 1 e 2 dias de tratamento.

Nesta abordagem, os *primers* de RT-qPCR foram desenhados para detectar o restante dos transcritos não-silenciados pela via de RNAi. Dessa forma, foi possível aferir, comparando com o grupo controle (AaC1-dsRNA), o quanto da expressão de GmA1 (**Figura 11**) e GmA2 (**Figura 10**) foram modulados durante 1 e 2 dias de absorção dos dsRNAs pelos discos de folha.

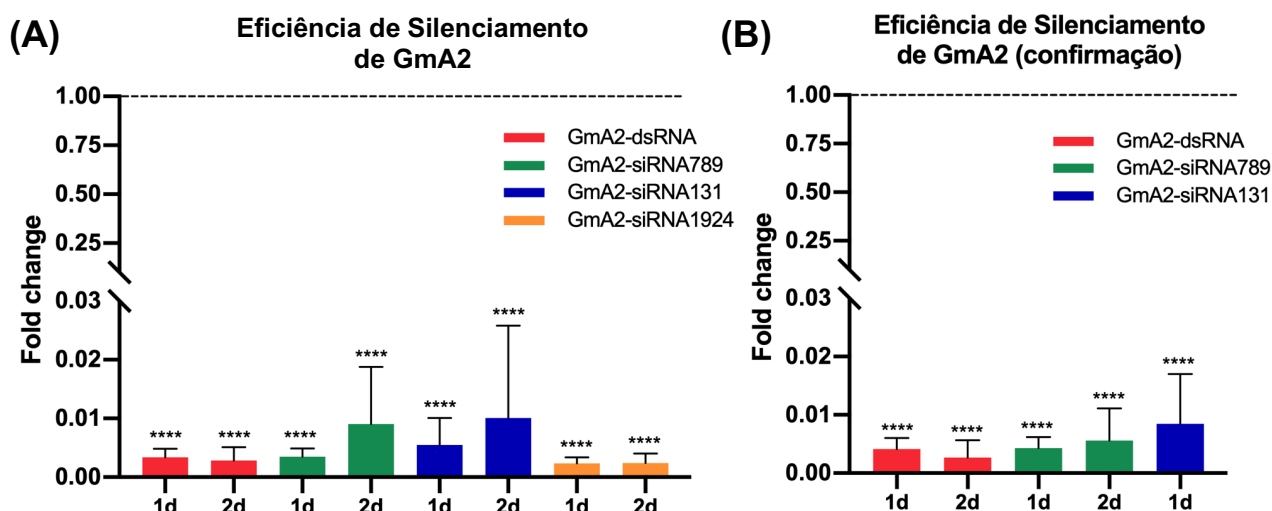


Figura 10. Validação do silenciamento do transcrito de GmA2 por expressão relativa durante 1 e 2 dias de absorção das soluções com diferentes efetores da via de RNAi. Foi utilizado o teste-T bicaudal pareado para as análises estatísticas, em que ****= $Pvalue < 0,0001$. As retas $y = 1$ dos gráficos representam a expressão das amostras do grupo controle (AaC1-dsRNA). A expressão dos genes foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Actina 7. **(A)** Resultados para o primeiro par de *primers*, GmA2-qPCR. **(B)** Resultados para o segundo par de *primers*, GmA2-qPCR-2.

Na **Figura 10A** os discos de folha foram significativamente silenciados durante 1 e 2 dias pós-exposição para todos os efetores de RNA: GmA2-dsRNA; GmA2-siRNA789; GmA2-siRNA131; e GmA2-siRNA1924. A eficiência do silenciamento foi $>99\%$ para os dois dias avaliados. Um segundo par de *primers* também foi utilizado para confirmar os resultados de parte das amostras (**Figura 10B**).

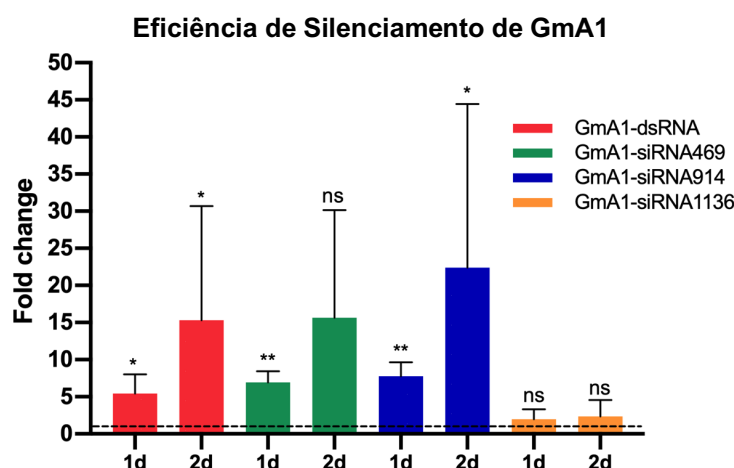


Figura 11. Avaliação da modulação do transcrito de GmA1 por expressão relativa durante 1 e 2 dias de absorção das soluções com diferentes efetores de RNA. Foi utilizado o teste-T bicaudal pareado para as análises estatísticas, em que * = $Pvalue < 0,05$, ** = $Pvalue < 0,01$ e ns = não significativo. A reta $y = 1$ do gráfico representa a expressão das amostras do grupo controle (AaC1-dsRNA). A expressão dos genes foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Actina 7.

Na **Figura 11**, é possível afirmar que no primeiro dia de silenciamento, com exceção do GmA1-siRNA1136, houve uma modulação positiva significativa dos transcritos de GmA1 entre 5-10 vezes em comparação ao grupo controle. Já no segundo dia, apenas com a utilização

dos efetores GmA1-dsRNA ($\cong$ 15 vezes) e GmA1-siRNA914 ($\cong$ 23 vezes) houve validação estatística deste aumento, mesmo com valores notavelmente altos de desvio padrão.

Esse comportamento demonstra um efeito rebote nas tentativas de silenciamento de GmA1, o que sugere que houve um *feedback* positivo intenso na via de síntese dessa proteína como resposta aos transcritos que foram comprometidos pela via de RNAi.

4.2 Resultados para *Spodoptera frugiperda*

Primeiramente estão apresentadas as sequências de óligos referentes aos genes-candidatos SfA1, SfA2, SfA3, SfA4 e SfA5 relacionados a ressensibilização de diferentes classes de defensivos agroquímicos em *Spodoptera frugiperda*. Após, são expostos os resultados de eficiência de reação e validação do silenciamento dos transcritos.

4.2.1 Efetores de RNA para *Spodoptera frugiperda*

Os resultados deste tópico apresentam as sequências de *primers* precursores dos dsRNA dos diferentes genes-candidatos e as sequências de *primers* utilizados para avaliação da eficiência do silenciamento (**item 4.2.1.1**). Além disso, também estão dispostas as localizações de cada um destes elementos em um mapa de cada transcrito-alvo (**item 4.2.1.2**).

4.2.1.1 Óligos Relacionados com o Silenciamento de *Spodoptera frugiperda*

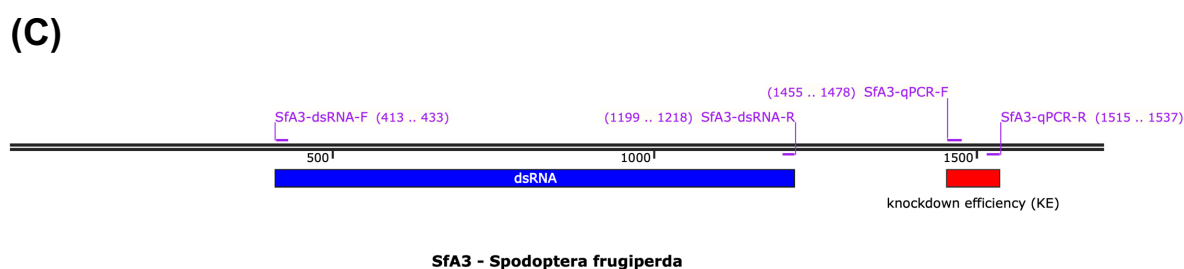
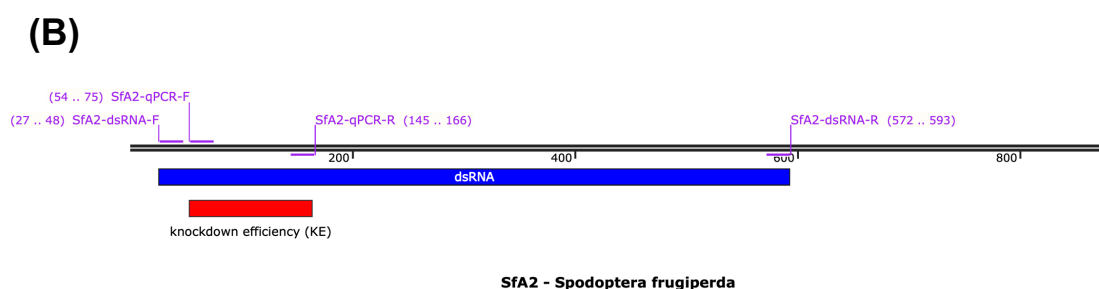
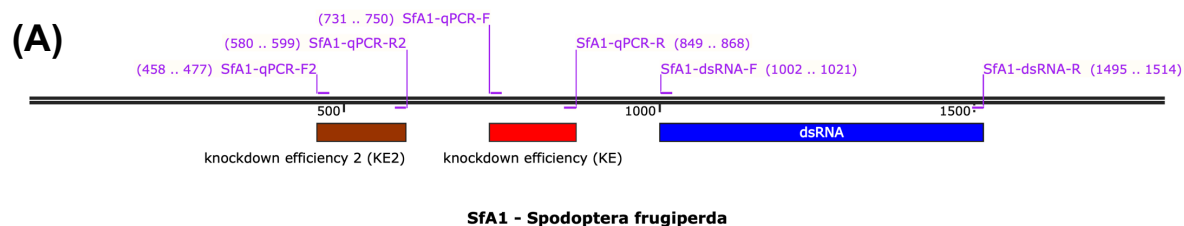
Na **Tabela 6** estão expostas as sequências de *primers* para *Spodoptera frugiperda* cujo *design* passou por todas as etapas descritas no **item 3.2.1**. Os *primers* identificados como ‘Síntese de dsRNA’ foram utilizados para isolar as regiões de interesse dos transcritos (**item 3.3.1**) para posterior síntese dos dsRNA, as sequências em negrito referem-se a região promotora T7 que ancora na enzima transcriptase, responsável pela síntese.

Nome	Alvo	Função	Sequencia (5'-3')
SfA1-dsRNA-F	SfA1	Síntese de dsRNA	TAATACGACTCACTATAGGCATATCCGATGTGTGGGCGA
SfA1-dsRNA-R			TAATACGACTCACTATAGGAGCGGCGTCATACTCAACAA
SfA1-qPCR-1F	SfA1	Expressão Relativa	CTAGTGGTACAGGCAGCGAG
SfA1-qPCR-1R			CAGGCATGGTAAGGGTGTGT
SfA1-qPCR-2F			CGCTCACTAGGAACGGAGTC
SfA1-qPCR-2R			ATCACGGAACCACCTCCAAC
SfA2-dsRNA-F	SfA2	Síntese de dsRNA	DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
SfA2-dsRNA-R			DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
SfA2-qPCR-F	SfA2	Expressão Relativa	DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
SfA2-qPCR-R			DADO SENSÍVEL À PROPRIEDADE INTELECTUAL
SfA3-dsRNA-F	SfA3	Síntese de dsRNA	TAATACGACTCACTATAGGTTCCATGCTGACGGAGACAC
SfA3-dsRNA-R			TAATACGACTCACTATAGGCGGGCACATGGTAGTCTCTT
SfA3-qPCR-F	SfA3	Expressão Relativa	AAGTTCCAAGTGGAGCCATCGAGG
SfA3-qPCR-R			CCTCCTTTGGGCCCGACGAGAAG
SfA4-dsRNA-1F	SfA4	Síntese de dsRNA	TAATACGACTCACTATAGGCAGAAGCTGTCCACTGTCCA
SfA4-dsRNA-1R			TAATACGACTCACTATAGGAACACAATGGCCTGTCTTCC
SfA4-dsRNA-2F			TAATACGACTCACTATAGGTTACTTCGGAGGAAACCCGC
SfA4-dsRNA-2R			TAATACGACTCACTATAGGGCGGTTCTAATCGGATCGT
SfA4-dsRNA-3F			TAATACGACTCACTATAGGGCGGTGGGTTTTACTCAGGA
SfA4-dsRNA-3R			TAATACGACTCACTATAGGCCGCCGACTCACCGAATAAT
SfA4-qPCR-F	SfA4	Expressão Relativa	GTTGAACCCTGACGATCCGA
SfA4-qPCR-R			GTTTCTGCATACCGATGGGC
SfA5-dsRNA-F	SfA5	Síntese de dsRNA	TAATACGACTCACTATAGGTCCACGTAGAGGAGCATCCC
SfA5-dsRNA-R			TAATACGACTCACTATAGGCACGAGAACAACCACATCGC
SfA5-qPCR-F	SfA5	Expressão Relativa	GTATGAGACGTGGTTCAAGACTCCC
SfA5-qPCR-R			TCCAATGTTTCTGAGACCCGTTC
BtC1-dsRNA-F	BtC1	Síntese de dsRNA (Controle negativo)	TAATACGACTCACTATAGGGAGTCAGTGAGCGAGGAAGC
BtC1-dsRNA-R			TAATACGACTCACTATAGGTATCCGCTCACAATTCCACA
SfHK2-qPCR-F	GAPDH	Expressão Relativa (Constitutivo)	AGAAGACTGTTGACGGACC
SfHK2-qPCR-R			AGGAATGACTTTGCCGAC

Tabela 6. Sequências de oligonucleotídeos para os transcritos dos genes SfA1, SfA2, SfA3, SfA4 e SfA5 de *Spodoptera frugiperda* para síntese de dsRNA e expressão relativa, bem como o par de óligos para o gene constitutivo GAPDH e BtC1 para síntese do dsRNA aplicado nos grupos controle negativo.

4.2.1.2 Alvos e Localização dos Óligos Relacionados com o Silenciamento de *Spodoptera frugiperda*

Neste projeto foram estabelecidos 5 alvos para o silenciamento de *Spodoptera frugiperda*, todos com a função de degradação de classes específicas de defensivos agrícolas: os transcritos de SfA1 estão relacionados a resistência aos neonicotinóides (YANG et al., 2017) (**Figura 12A**); já SfA2 e SfA3 compõem uma complexa cadeia metabólica que resulta na resistência à toxina Cry1A, produzida pela culturas de plantas OGM com tecnologia Bt (**Figura 12B e Figura 12C**); por sua vez, SfA4, está envolvido na resistência aos organofosforados (CARVALHO et al., 2013) (**Figura 12D**); e por fim, SfA5, cuja expressão gera um efeito de resistência às classes das diamidas (TAN et al., 2022) (**Figura 12E**). As sequencias dos transcritos utilizados podem ser obtidas pelo banco de dados do NCBI <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> com os respectivos números de acesso: XM_050699107.1; dado sensível à propriedade intelectual; XR_007707420.1; KC435023.1; e OL614005.1.



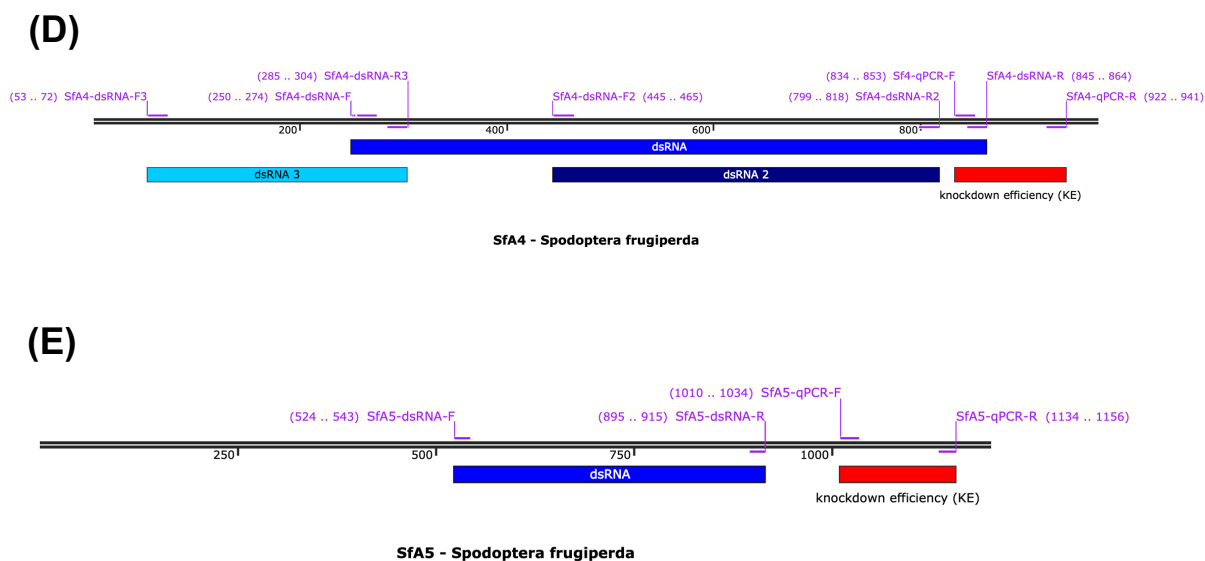


Figura 12. Mapa com a localização dos diferentes óligos utilizados para o silenciamento e detecção dos transcritos-alvo. As linhas em preto representam a sequência do transcrito, enquanto os elementos: Azul= dsRNAs; Vermelho ou Marrom= *amplicons* para expressão relativa; Roxo= *primers*. **(A)** Mapa dos óligos referentes ao alvo SfA1. **(B)** Mapa dos óligos referentes ao alvo SfA2. **(C)** Mapa dos óligos referentes ao alvo SfA3. **(D)** Mapa dos óligos referentes ao alvo SfA4. **(E)** Mapa dos óligos referentes ao alvo SfA5.

4.2.2 Eficiência de Reação para Expressão Relativa em *Spodoptera frugiperda*

A **Tabela 7** apresenta valores otimizados para os *primers*, relacionados a: concentração ótima de reação (**Conc.**); temperatura de anelamento (**TA**); coeficiente **Slope** resultante; e valores de eficiência de reação (**E**) deduzidos através da **Fórmula 1**.

Nome	Espécie	Alvo	Conc.	TA	Slope	E (u.a.)	E (%)	R ²
SfA1-qPCR	<i>Spodoptera frugiperda</i>	SfA1	-	-	-	-	-	-
SfA2-qPCR		SfA2	900 µM	56 °C	-3,28	2,03	103,5%	0,94
SfA3-qPCR		SfA3	-	-	-	-	-	-
SfA4-qPCR		SfA4	-	-	-	-	-	-
SfA5-qPCR		SfA5	-	-	-	-	-	-
SfHK2-qPCR		GAPDH	900 µM	56 °C	-3,34	1,99	100%	1,00

Tabela 7. Valores deduzidos ao longo da avaliação de eficiência de reação para cada par de *primers* utilizados para avaliar a expressão relativa dos diferentes transcritos-alvo, bem como do constitutivo GAPDH de *Spodoptera frugiperda*.

Como pode ser observado na **Tabela 7**, os parâmetros otimizados de *primers*, bem como valores de eficiência de reação foram obtidos apenas para o transcrito SfA2 e para o constitutivo GAPDH, uma vez que as expressões basais destes genes se demonstraram suficientemente altas para a detecção por RT-qPCR.

Os transcritos para os genes SfA1, SfA3, SfA4 e SfA5, por outro lado, apresentaram uma baixa expressão basal, ao ponto da técnica de RT-qPCR não ser capaz de detectá-los. Sendo assim, não foi possível prosseguir com a eficiência de reação desses alvos, bem como validar o seu silenciamento, impossibilitando a utilização destes alvos em todos os ensaios posteriores.

4.2.3 Silenciamento em *Spodoptera frugiperda*

Nesta abordagem, os *primers* para RT-qPCR foram desenhados com a finalidade de detectar os transcritos modulados pela administração de dsRNA para SfA2 em *Spodoptera frugiperda*. Dessa forma, foi possível aferir, comparando com o grupo controle (BtC1) a dinâmica de expressão deste alvo 1, 2 e 4 dias pós-microinjeção (**Figura 13**).

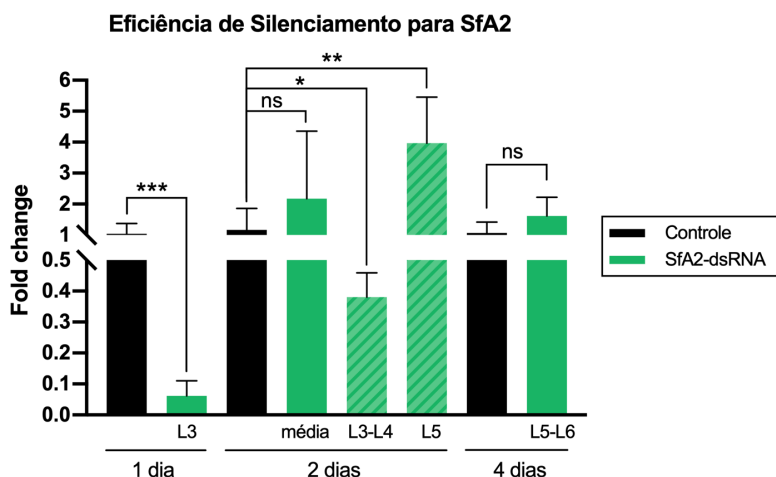


Figura 13. Validação do silenciamento e dinâmica de expressão do transcrito de SfA2 em *Spodoptera frugiperda* por expressão relativa durante 1, 2 e 4 dias pós-microinjeção com dsRNA. As barras em preto representam a expressão das amostras do grupo controle (BtC1). A expressão dos genes foi normalizada em função da expressão do constitutivo GAPDH. No eixo X do gráfico também são apresentadas as faixas de instares larvais encontradas em cada grupo amostral, variando entre o terceiro (L3) e o sexto instar (L6) nas coletas mais tardias. Foi utilizado o teste-T bicaudal não-pareado para as análises estatísticas, em que * = $Pvalue < 0,05$, ** = $Pvalue < 0,01$, *** = $Pvalue < 0,005$ e ns = não significativo.

Ao analisar a dinâmica de expressão de SfA2 pela **Figura 13**, observa-se no primeiro dia pós-microinjeção um silenciamento significativo >99% dos transcritos, os quais retornam a sua expressão padrão no quarto dia pós-microinjeção.

No período intermediário de 2 dias pós-microinjeção, apesar da média das 6 réplicas não apresentarem modulações com significância estatística, ao separar os 3 *pools* com instares tardios (L5), dos outros 3 *pools* com indivíduos entre L3 e L4, a expressão deles foi estatisticamente validada.

Para os *pools* com indivíduos entre L3 e L4 houve a continuidade do silenciamento >99%. Enquanto para os *pools* com indivíduos exclusivamente em L5, uma modulação positiva de 3 a 4 vezes foi observada. Para este comportamento, sugere-se que a modulação positiva de SfA2 deve-se a um efeito rebote, provavelmente por um *feedback* positivo de sua via de síntese. Entretanto, esta superexpressão se demonstrou temporária, uma vez que houve a normalização dos níveis de expressão do gene ao quarto dia pós-microinjeção; agora, com *pool* formado exclusivamente por indivíduos em instares tardios (L5 e L6).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Utilizando *Glycine max* como espécie modelo para *Eichhornia crassipes*, levantou-se 2 alvos já utilizados pela indústria de herbicidas, o gene GmA1 e o gene GmA2 (ERICKSON et al., 1989; DE SOUSA et al., 2014; PFISTER; ARNTZEN, 2014; SILVA et al., 2016; ZHOU et al., 2007; TRANEL; WRIGHT, 2002; WHITCOMB et al., 1999). O silenciamento dos transcritos de GmA1 gerou o efeito inverso do especulado, resultando em sua superexpressão de 5 a 23 vezes, a depender das condições analisadas. Apesar deste resultado não convergir diretamente com os interesses propostos nesta investigação, por estar intimamente relacionado com a fotossíntese, a modulação positiva de GmA1 teria o potencial para auxiliar no desenvolvimento de plantas e na produção agrícola, abrindo uma nova perspectiva de investigações (WANG et al., 2022; HUO et al., 2015; EDELMAN; MATOO, 2005).

Já na avaliação dos transcritos de GmA2, este alvo se demonstrou facilmente silenciável em *Glycine max*, chegando a mais de 99% para todos os 4 efetores utilizados, o que indica um relevante potencial para o auxílio no manejo integrado de pragas vegetais. Entretanto, para que seja investigado mais profundamente a viabilidade deste transcrito-alvo, é necessário garantir

que essas macromoléculas de RNA sejam capazes de efetivamente se translocar e atingir os diferentes tecidos da planta.

Nos ensaios de translocação, o efetor de RNA foi apenas detectado nas folhas às quais ele foi aplicado, não sendo detectado em outros tecidos de *Glycine max* como caule, raízes e outras folhas não-aplicadas. Tais resultados demonstram que para garantir a absorção e translocação dessas macromoléculas são necessários excipientes específicos, junto a solução-efetora de RNA. Desta forma, auxiliando a passagem, por exemplo, pelas camadas de cera foliar, pela parede celular das células vegetais e principalmente pela dinâmica célula-célula. Fica exposta, portanto, a necessidade de estudos paralelos que sejam direcionados a esta finalidade (KOEPPPE et al. 2023; HOANG et al., 2022; MITTER et al., 2019; DALAKOURAS et al., 2018)

Os resultados do ensaio de translocação em plantas se demonstraram relevantes para direcionar a abordagem de controle por RNA em alvos entomológicos. Pois, permitiram direcionar esforços para estudos em insetos que se alimentam de tecidos vegetais aos quais essas soluções efetoras de RNA sejam mais facilmente absorvidas, como o das folhas. Filtrando inicialmente pragas como a exemplo da *Bemisia tabaci* que, apesar de, ao ser comparada a *Spodoptera frugiperda* ter uma abrangência maior de culturas comprometidas, se alimenta exclusivamente da seiva presente no floema das plantas.

Nas avaliações em *Spodoptera frugiperda*, dos 5 candidatos com potencial para ressensibilização de diferentes classes de defensivos, SfA1, SfA3, SfA4 e SfA5 não puderam ter sua expressão avaliada por decorrência da baixa expressão basal destes genes nesta espécie. Para que estes alvos possam ser futuramente contemplados em estudos como este, sugere-se

previamente, estudos dedicados à indução da expressão destes genes para que então possam ser retomadas as avaliações de silenciamento.

Já o transcrito de SfA2, se demonstrou facilmente silenciável em *Spodoptera frugiperda*, chegando a mais de 99% no primeiro dia avaliado. No segundo dia, o instar larval parece definir se há continuidade do silenciamento (PENG et al., 2019), como observado em *pools* com L3 e L4; ou se há uma superexpressão de até 4 vezes em *pools* apenas com instares L5. Entretanto, para todos os efeitos, no quarto dia as modulações cessam e a expressão de SfA2 é normalizada. Sugere-se, portanto, que a janela de ação para a aplicação do defensivo em campo seria de até 1 dia após a aplicação do efector de RNA, se estendendo para 2 dias em instares larvais mais jovens.

O transcrito de SfA2, portanto, apresentou um grande potencial para o manejo de *Spodoptera frugiperda* com possíveis resultados na ressensibilização à endotoxina Cry1A (GONG et al., 2020; CHEN et al., 2020; GUO et al., 2020; ZHANG et al., 2019; WEI et al., 2016; RODRÍGUEZ–CABRERA et al., 2010). Entretanto, para que seja investigado mais profundamente a viabilidade deste transcrito-alvo em ensaios mais próximos à aplicação em campo, seriam necessários estudos mais aprofundados de excipientes na solução-efetora, que garantissem a princípio: a proteção contra a fotodegradação pela luz solar; a absorção cutânea pelos insetos; e a estabilidade no trato digestivo, caso seja ingerida junto ao tecido foliar (COOPER et al., 2019; SONG et al., 2018; DUBROVINA; KISELEV, 2019; DAS; SHERIF, 2020; GILLET, F. X.; et al.; CHEN et al., 2016; ENGEL; MORAN, 2013; GRIEBLER et al., 2008).

Diante das considerações descritas, as moléculas efectoras da via de RNA de interferência apresentaram um grande potencial para justificar estudos mais aprofundados que

viabilizem a sua utilização no manejo integrado de pragas. Para tal, reforça-se a necessidade de encontrar diferentes tipos excipientes que viabilizam o escalonamento dessas moléculas em avaliações em campo, bem como para idealização de produtos comerciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AMARAL, R. J. V.; DANSÁ-PETRETSKI, M. Interação patógeno-vetor: Dengue. In: SILVA-NETO, M. A. C.; WINTER, C.; TERMIGNONI, C. **Tópicos avançados em entomologia molecular**. 1. ed. Rio de Janeiro: INCT- Entomologia Molecular, 2012.

BAKER, B. P.; GREEN, T. A.; LOKER, A. J. Controle biológico e manejo integrado de pragas em sistemas orgânico e convencional. **Controle Biológico**, v. 140, 104095, 2020.

BOLZAN, A. et al. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest Management Science**, v. 75, n. 10, p. 2682-2689, 2019.

BRODERICK, N. A.; WELCHMAN, D. P.; LEMAITRE, B. Recognition and response to microbial infection in *Drosophila*. In: ROLFF, J.; REYNOLDS, S. E. **Insect infection and immunity: Evolution, ecology, and mechanisms**. 1. ed. Nova Iorque: Oxford University Press, 2009.

CAI, Q. et al. Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi—nature's blueprint for modern crop protection strategies. **Current Opinion in Microbiology**, v. 46, p. 58-64, 2018.

CARVALHO, R. A. et al. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, e62268, 2013.

CHEN, G. et al. Differences in midgut transcriptomes between resistant and susceptible strains of *Chilo suppressalis* to Cry1C toxin. **BMG Genomics**, v. 21, n. 1, 632, 2020.

CHEN, B. et al. Biodiversity and Activity of the gut microbiota across the life history of the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. **Nature Scientific Reports**, v. 6, n. 29505, p. 1-14, 2016.

CHRISTIAENS, O.; NIU, J.; TANING, C. N. T. RNAi in Insects: A Revolution in Fundamental

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023 (2002).

Research and Pest Control Applications. **Insects**, v. 11, n.7, p. 415, 2020.

COOPER, A. M. et al. Molecular Mechanisms Influencing Efficiency of RNA Interference in Insects. **Pest Management Science**. v. 75, p. 18–28, 2019.

DALAKOURAS, A. et al. Genetically Modified Organism-Free RNA Interference: Exogenous Application of RNA Molecules in Plants. **Plant Physiology**, v. 182, n. 1, p. 38–50, 2020.

DALAKOURAS, A. et al. Delivery of Hairpin RNAs and Small RNAs Into Woody and Herbaceous Plants by Trunk Injection and Petiole Absorption. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, a1253, 2018.

DAS, P. R.; SHERIF, S. M. Application of Exogenous dsRNAs-induced RNAi in Agriculture: Challenges and Triumphs. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

DE SOUSA, C. P. et al. Photosynthesis of soybean under the action of a photosystem II-inhibiting herbicide. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, p. 3051-3062, 2014.

DEVINE, M. D.; SHUKLA, A. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. **Crop Protection**, v.19, p.881-889, 2000.

DUBROVINA, S. A.; KISELEV, K. V. Exogenous RNAs for Gene Regulation and Plant Resistance. **International Journal in Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2282, 2019.

EDELMAN, M.; MATOO A. The D1 Protein: Past and Future Perspectives. **ResearchGate Articles**, 2005.

ELLENDORFF, U et al. RNA silencing is required for Arabidopsis defense against *Verticillium* wilt disease. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, i. 2, p. 591–602, 2009.

ENGEL, P.; MORAN, N. A. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 699-735, 2013.

ERICKSON, J. M. et al. Molecular and biophysical analysis of herbicide-resistant mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*: structure-function relationship of the photosystem II D1 polypeptide. **The Plant Cell**, v. 1, n. 3, p. 361–371, 1989.

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

FLETCHER, S.; et al. A Perspective on RNAi-Based Biopesticides. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 51, 2020.

FUKUHARA, T.; MORIAYAMA, H. Endornavirus. In: MAHY, B. W. J.; VAN-REGENMORTEL, M. H. V. (Eds.) **Encyclopedia of Virology (Third Edition)**. 3 ed. Cambridge: Academic Press, p. 109-116, 2008.

GENTELINI, A. L. et al. Biomass production of the aquatic macrophytes *Eichhornia crassipes* (water hyacinth) and *Egeria densa* (Egeria) in organic fish farm effluent treatment system. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 2, p. 441-448, 2008.

GILLET, F. X.; et al. Investigating Engineered Ribonucleoprotein Particles to Improve Oral RNAi Delivery in Crop Insect Pests. **Frontiers in Physiology**, v. 8, a256, 2017.

GIRAUDO, M. et al. Cytochrome P450s from the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*): responses to plant allelochemicals and pesticides. **Insect Molecular Biology**, v. 24, n. 1, p. 115-128, 2015.

GONG, L. et al. Reduced Expression of a Novel Midgut Trypsin Gene Involved in Protoxin Activation Correlates with Cry1Ac Resistance in a Laboratory-Selected Strain of *Plutella xylostella* (L.). **MDPI Toxins**, v. 12, n. 2, 72, 2020.

GRIEBLER, M. et al. RNA Interference with the Allatoregulating Neuropeptide Genes from the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* and its Effects on the JH Titer in the Hemolymph. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p. 997-1007, 2008.

GUO, Z. et al. Comprehensive analysis of Cry1Ac protoxin activation mediated by midgut proteases in susceptible and resistant *Plutella xylostella* (L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 163, p. 23-30, 2020.

HAN, S. et al. Selection and Evaluation of Reference Genes for qRT-PCR in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insects**, v. 12, n. 10, p. 902, 2021.

- HEIGWER, F. et al. RNA Interference (RNAi) Screening in *Drosophila*. **Genetics**, v. 208, n. 3, p. 853-874, 2018.
- HOANG, L. et al. RNAi as a Foliar Spray: Efficiency and Challenges to Field Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, 6639, 2022.
- HUO, Y. et al. Overexpression of the Maize psbA Gene Enhances Drought Tolerance Through Regulating Antioxidant System, Photosynthetic Capability, and Stress Defense Gene Expression in Tobacco. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 1223, 2015.
- JARALEÑO-TENIENTE, J. et al. Egg parasitoids survey of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in maize and sorghum in Central Mexico. **Insects**, v. 11, n. 3, p. 157, 2020.
- KEBEDE, M.; FITE, T. RNA interference (RNAi) applications to the management of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Its current trends and future prospects. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, 944774, 2022.
- KOEPPE, S. et al. RNA Interference Past and Future Applications in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, 9755, 2023.
- KUMAR, A. et al. Mosquito Innate Immunity. **MDPI Insects**, v. 8, n. 3, 95, 2018.
- LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 697-743, 2007.
- LIRA, E. C. et al. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram: inheritance and cross-resistance to spinosad. **Pest Management Science**, v. 76, n. 8, p. 2674-2680, 2020.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- MA, S. et al. Expression Stabilities of Candidate Reference Genes for RT-qPCR under Different Stress Conditions in Soybean. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, e75271, 2013.

- MAJUMDAR, R.; RAJASEKARAN, K.; CARY, J. W. RNA Interference (RNAi) as a Potential Tool for Control of Mycotoxin Contamination in Crop Plants: Concepts and Considerations. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 200, 2017.
- MALAVOLTA, E. et al. On the mineral composition of water hyacinth (*Eichornia crassipes*). **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 46, n. 1, p. 155-162, 1989.
- MEDEIROS, R. M. L. et al. Estudo da biomassa de aguapé, para a produção do seu concentrado proteico. **Food Science and Technology**, v. 19, n. 2, p. 226-230, 1999.
- MITTER N. et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. **Nature Plants**, v. 3, 16207, 2017.
- MONTEZANO, D. G. et al. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology**, v. 26, n. 2, p. 286-300, 2018.
- MUHAMMAD, T. et al. RNA Interference: A Natural Immune System of Plants to Counteract Biotic Stressors. **MDPI Cells**, v. 8, n.1. p. 38, 2019.
- MURILLO, H. Predation of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs in cotton and corn in El Espinal, Tolima, Colombia. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 40, n. 1, p. 63-66, 2014.
- NEYUMEIER, J.; MEISTER, G. siRNA Specificity: RNAi Mechanisms and Strategies to Reduce Off-Target Effects. **Frontiers in Plant Science**, v.11, 2020.
- NOWOTNY, M.; YANG, W. Structural and functional modules in RNA interference. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 3, p. 286-293, 2009.
- O'KEEFE, E. P. siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing. **Materials and Methods**, v. 3, n. 197, 2013.
- PALLI, S. B. RNA interference in Colorado potato beetle: steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. **Current Opinion in Insect Science**, v. 5, p. 1-8, 2014.

- PENG, Y. et al. Identification and Characterization of Multiple dsRNases from a Lepidopteran Insect, the Tobacco Cutworm, *Spodoptera Litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticides Biochemical Physiology**, v. 162, p. 86-95, 2019.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, e45, 2001.
- PFISTER, K.; ARNTZEN, C. J. The Mode of Action of Photosystem II-Specific Inhibitors in Herbicide-Resistant Weed Biotypes. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 34, n. 11, p. 996-1009, 2014.
- RIZZARDI, M. A. et al. Plant resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **Planta Daninha**, v. 20, n. 1, 2002.
- RODRIGUES, T. B.; PETRICK, J. S. Safety Considerations for Humans and Other Vertebrates Regarding Agricultural Uses of Externally Applied RNA Molecules. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 407, 2020.
- RODRÍGUEZ-CABRERA, L. et al. RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 11, p. 2894-2903, 2010.
- RODRÍGUEZ-DE LA NOVAL, C. et al. Functional expression of a peritrophin A-like SfPER protein is required for larval development in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Scientific Reports**, v.9, 2630, 2019.
- SILVA, A. F. M. et al. Application of Post-Emergence ALS Inhibitor Herbicides Associated or Not to Glyphosate in RR/STS Soybean. **Planta Daninha**, v. 34, n. 4, 2016.
- SONG, H. et al. Contributions of dsRNases to Differential RNAi Efficiencies between the Injection and Oral Delivery of dsRNA in *Locusta migratoria*. **Pest Management. Science**, n. 75, p. 1707–1717, 2018.

SOUZA-NETO, J. A. et al. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 42, p. 17841-17846, 2009.

STORER, N. P. et al. Descoberta e caracterização da resistência de campo ao milho Bt: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em Porto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

TAN, Q. et al. Adipokinetic hormone signaling regulates cytochrome P450-mediated chlorantraniliprole sensitivity in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 78, n. 6, p. 2618-2628, 2022.

THOMAZ, S. M., CUNHA, E. R. The role of macrophytes in habitat structuring in aquatic ecosystems: methods of measurement, causes and consequences on animal assemblages' composition and biodiversity. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 22, n. 2, 2010.

THOMAZ, S. M.; BINI, L. M.; PAGIORO, T. A. Macrófitas aquáticas em Itaipu: ecologia e perspectivas para o manejo. In: THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. (Eds.). **Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas**. 21 ed. Maringá: EDUEM, p. 319-341, 2003.

TOMARI, Y., AND ZAMORE, P. D. Perspective: Machines for RNAi. **Genes & Development**, v. 19, n. 5, p. 517-529, 2005.

TRANEL, P. J.; WRIGHT, T. R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, v. 50, p. 700-712, 2002.

WANG, L. et al. GmFtsH25 overexpression increases soybean seed yield by enhancing photosynthesis and photosynthates. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 65, n. 4, p. 1026-1040, 2022.

WANG, W. et al. The Population Growth of *Spodoptera frugiperda* on Six Cash Crop Species and Implications for Its Occurrence and Damage Potential in China. **Insects**, v. 11, n. 9, 639, 2020.

WEI, J. et al. Activation of Bt Protoxin Cry1Ac in Resistant and Susceptible Cotton Bollworm. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, e0156560, 2016.

WHITCOMB, C. E. et al. An introduction to ALS-inhibiting herbicides. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, n. 1-2, p. 231-239, 1999.

YANG, X. et al. RNA interference-mediated knockdown of the hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase gene decreases thiamethoxam resistance in adults of the whitefly *Bemisia tabaci*. **Scientific Reports**, v. 24, 41201, 2017.

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

ZHANG, M. et al. Decreased Cry1Ac activation by midgut proteases associated with Cry1Ac resistance in *Helicoverpa zea*. **Pest Management Science**, v. 75, n. 4, p. 1099-1106, 2019.

ZHOU, Q. et al. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 89, n. 1, p. 89-96, 2007.

ZOTTI, M. J. et al. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, p. 1239-1250, 2018.

ZOTTI, M. J.; SMAGGHE, G. RNAi Technology for Insect Management and Protection of Beneficial Insects from Diseases: Lessons, Challenges and Risk Assessments. **Neotropical Entomology**, v. 44, n. 3, p. 197-213, 2015.