UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Victor Guimarães Ribeiro

PROSPECÇÃO DO RNAi COMO FERRAMENTA DE CONTROLE DA LAGARTA *Helicoverpa armigera*

Rio de Janeiro

2020

Victor Guimarães Ribeiro

PROSPECÇÃO DO RNAi COMO FERRAMENTA DE CONTROLE DA LAGARTA *Helicoverpa armigera*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso

Rio de Janeiro

2020

Guimarães Ribeiro, Victor

PROSPECÇÃO DO RNAi COMO FERRAMENTA DE CONTROLE DA LAGARTA Helicoverpa armigera / Victor Guimarães Ribeiro. -- Rio de Janeiro, 2020.

73 f.

Orientadora: Monica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, 2020.

1. Helicoverpa armigera. 2. RNA de interferência. 3. Controle de praga agrícola. 4. Pesticida. 5. Tecnologia de controle. I. Ferreira Moreira Carvalho Cardoso, Monica, orient. II. Título.

Victor Guimarães Ribeiro

Prospecção do RNAi como ferramenta de controle da lagarta *Helicoverpa armigera*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Aprovada em

_____

Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso

Doutora em Química Biológica / Instituto de Química/ CCMN / UFRJ

Orientadora

_____

Georgia Correa Atella

Doutora em Química Biológica / Instituto de Bioquímica Médica / CCS / UFRJ

Titular Externo

_____

Bianca Cruz Neves

PhD pelo Imperial College London / Instituto de Química/ CCMN / UFRJ

Titular Interno

Márcia Regina Soares da Silva

Doutora em Ciências Biológicas / Instituto de Química/ CCMN / UFRJ

Titular Interno

Danielle Maria Perpétua de Oliveira Santos

Doutora em Ciências Biológicas / Instituto de Química/ CCMN / UFRJ

Suplente

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a minha querida mãe, a pessoa mais importante da minha vida, por seu amor incondicional. Tenho certeza que ao pôr em prática tudo que a senhora me ensinou sobre caráter, respeito ao próximo e perseverança, terei êxito em todos meus objetivos.

A meu pai (*in memoriam*), que mesmo nos deixando tão cedo, me ensinou a nunca ter medo de errar e principalmente ser competente em consertar os erros.

Ao meu irmão Diego por ser o maior exemplo de que quando temos um sonho e corremos atrás, o sucesso é apenas consequência.

A todos meus familiares, tios, tias e primos. Mas há uma pessoa em especial a quem dedico esse trabalho com muito amor: minha avó Verônica (*in memoriam*). Poder ter estado ao meu lado desde o dia em que nasci e principalmente até quando nos deixou, este foi seu maior presente para mim. Nunca esquecerei a importância de tudo o que você me ensinou.

À Monique, pelo apoio, amizade e por estar ao meu lado incentivando nos momentos bons e ruins. Minha gratidão e amor.

À minha orientadora Mônica por toda confiança, ensinamento, amizade, e por estar sempre disponível para discutir o desenvolvimento do projeto.

Aos amigos de laboratório: professora Ana Cláudia, Tiago Salles, Thayane, Brenda e Evelyn, a vocês meu muito obrigado por fazerem do nosso lab um ambiente de trabalho agradável.

Ao suporte financeiro da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) através do financiamento do projeto de pesquisa contemplados: programa pesquisa Zika, Chikungunya e dengue E-26/201.3312016 18/2015 e bolsa - E26/201.703/2018 (239746).

A empresa Vital Force pelo grande incentivo e suporte neste projeto, em especial ao Josegueri Céleri e a Juliana Braga por estarem sempre dispostos a nos ajudar.

RESUMO

A lagarta *Helicoverpa armigera* (Hübner) é uma espécie conhecida por sua característica de polifagia, o inseto é capaz de se alimentar de aproximadamente 200 espécies de plantas hospedeiras, sendo incriminada nas grandes perdas no plantio de cana-de-açúcar, milho, algodão e principalmente soja. Os prejuízos anuais associados a esta espécie estimam-se na ordem de 5 bilhões de dólares em todo o mundo. O uso de inseticidas químicos é o principal método de controle da lagarta. Existem poucos inseticidas químicos ativos, disponíveis no mercado, pois as populações do inseto encontram-se resistentes em função da pressão seletiva e de aplicações inadequadas dos produtos, dificultando o manejo de praga nas culturas. Neste contexto, a técnica de RNA de interferência (RNAi) apresenta-se como uma alternativa para o controle de diversos insetos-praga, sendo uma técnica com alta especificidade, permitindo o silenciamento em regiões gênicas específicas, dificultando o desenvolvimento de resistência. O desafio para utilização de RNAi como pesticidas é a identificação de genes alvos apropriados. A quitina, polímero de N-acetilglicosamina, é abundante em estruturas importantes que garantem a sobrevivência do inseto. Assim, os genes envolvidos na via de biossíntese de quitina, como a enzima quitina sintase (CHS), constituem-se bons alvos para o RNAi, permitindo o controle seletivo de insetos. Uma região no gene *CHSA* e duas no *CHSB* de *H. armigera* foram selecionadas para produção de dsRNA A, dsRNA B e dsRNAB, respectivamente. O perfil de expressão dos genes *CHSA* e *CHSB* foram determinados ao longo do desenvolvimento do inseto por PCRq. A administração de dsRNA A e B, nas doses 1 e 10 µg, por alimentação, promoveu uma mortalidade significativa entre 60-80%, em relação ao controle. Os dsRNA A, dsRNA B e dsRNAB administrados, nas doses 1 e 10 µg, por via tópica, promoveram a taxa de mortalidade de 80-90%, sem diferenças significativas entre as construções, mas diferente do grupo controle. No fenótipo, os insetos tratados com as diferentes construções, foi observado um notável atraso no crescimento, extravasamento de conteúdo interno na altura da cabeça, escurecimento e deformação na cutícula de larvas e pupas. Também um fenótipo de interrupção no desenvolvimento, com a estagnação do inseto entre os estágios de lagarta e pupa. Após o tratamento tópico com os dsRNAs na dose de 10,0 µg para silenciamento de *CHSA* e *CHSB* foi observado que as três construções reduziram o peso das lagartas na ordem de 30-38% quando comparado com o grupo controle. Na pupa também ocorreu a perda de peso na ordem de 37 e 28% para os tratamentos com dsRNA A e dsRNA B, respectivamente. O *CHSA* foi comprovadamente silenciado no 3º dia após o tratamento com dsRNA A, como mostrado por PCRq, o que justifica a redução no peso e os fenótipos encontrados. As construções de dsRNA B e dsRNA AB gerou uma super expressão do *CHSA* que precisa ser melhor investigada. No *CHSB*, o silenciamento com dsRNA B não foi comprovado, no 3º dia após o tratamento, entretanto, observou-se uma significativa redução dos pesos e os fenótipos, tanto em larva quanto em pupa, sugerindo que o silenciamento possa ter sido efetivo em algum período após o tratamento. O dsRNA A não alterou a expressão do *CHSB*. No grupo tratado com dsRNA AB foi observada uma super expressão do *CHSB*, no 3º dia após o tratamento. Esse grupo apresentou fenótipo semelhante aos demais e teve a menor perda de peso quando comparado com o grupo controle (dsRNA GFP), sugerindo que esta super expressão possa ter contribuído para a diminuição da intensidade do fenótipo, perda de peso. O presente estudo é uma prova de conceito substanciada de que o RNAi tendo como alvo as CHSs de *H. armigera* pode ser utilizado no controle da lagarta.

ABSTRACT

The *Helicoverpa armigera* (Hübner) caterpillar is a species known for its polyphagic characteristic, the insect is capable to feed on approximately 200 species of host plants, being incriminated in the great losses in the crop of sugar cane, corn, cotton and mainly soy. The annual losses associated with this species are estimated at around 5 billion dollars worldwide. The use of chemical insecticides is the main method control. There are few active chemical insecticides available, because the insect populations are resistant due to the selective pressure and inadequate product applications, making difficult pest management in crops. In this context, RNA interference technique (RNAi) presents as an alternative strategy to control several pest insects, being a technique with high specificity, allowing gene silencing in specific gene regions, hindering the development of resistance. The key challenge for RNAi application as pesticides is to identify appropriate target genes. Chitin, a N-acetylglucosamine polymer is abundant in important structures that guarantee insect survival. The genes involved with chitin biosynthesis pathway, such as chitin synthase enzymes (CHS) are good target genes for RNAi, allowing selective insect controlling. One CHSA gene region and two CHSB gene region of H. armigera were selected to produce dsRNA A, dsRNA B and dsRNAB, respectively. The gene expression profile of CHSA and CHSB genes were determined throughout the insect development by PCRq. The administration of dsRNA A and dsRNA B, 1 and 10 µg doses, by oral feeding has led to a significant mortality between 60-80% compared to the control group. The dsRNA A, dsRNA B and dsRNA AB administering, 1 and 10 µg doses, topically, have led to a mortality rate of 80-90%, without significant differences between the constructions, but different from the control group. About phenotype, in insects group treated with dsRNA constructions, was observed growth reduction, internal content leakage near head, larvae and pupae cuticle darkening and deformation. A phenotype of development interruption, which the insect develop stagnation was observed between the caterpillar and pupa stages. After dsRNA topical treatment with 10 µg dose for silencing CHSA and CHSB, was observed that the all constructions reduced the weight of the caterpillars around 30-38% when compared to the control group. The pupae stage also lost weight around 37 and 28% after dsRNA A and dsRNA B treatments, respectively. The CHSA gene was silenced on the 3rd day after dsRNA A treatment as shown by PCRq, which justifies the weight reduction and the phenotypes found. The dsRNA B and dsRNA AB constructions generated an overexpression of CHSA gene which needs to be further investigated. For CHSB gene the dsRNA B silencing was not effective, on the 3rd day after treatment, although larvae and pupae have showed weight reduction and phenotypes, suggesting that the gene silencing might have been effective in some period after treatment. The dsRNA A treatment did not change CHSB gene expression, but weight loss and insect deformation phenotypes were observed. In addition, dsRNA AB treated group have occurred a CHSB gene overexpression on the 3rd day after treatment. This group had the less weight loss when compared to the control group (dsRNA GFP), suggesting that this overexpression may have contributed to the reduction of weight loss phenotype intensity. The present study is a substantiated proof of concept that RNAi targeting an *H. armigera* CHS can be used to control the caterpillar.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Aspectos econômicos 1
1.2 *Helicoverpa armigera* 2
1.2.2 Características bioecológicas de *H. armigera* 2
1.2.2 Ovo 4
1.2.3 Estádios Larvais 5
1.2.4 Pupa 7
1.2.5 Adulto 7
1.3 Ocorrência e prejuízos econômicos relacionados à *Helicoverpa armigera* ... 8
1.4 Controle de *Helicoverpa armigera* 11
1.5 RNA de interferência como ferramenta de controle de insetos 15
1.6 Quitina sintase como alvo molecular de silenciamento gênico 18
2. OBJETIVOS 21
2.1 Objetivo geral 21
2.2 Objetivos específicos 21
3. METODOLOGIA 22
3.1 Manutenção da colônia de *H. armigera* 22
3.2 Busca das sequências dos genes *CHSA* e *CHSB* de *H. armigera* e seleção das regiões alvo de silenciamento 22
3.3 Extração de RNA e síntese de cDNA 23
3.4 Amplificação por PCR convencional 23
3.5 Análise de expressão dos genes *CHS* por PCR quantitativo 24
3.6 Síntese do dsRNA 25
3.7 Administração do dsRNA na dieta artificial 27
3.8 Administração do dsRNA por via tópica 27
4. RESULTADOS 28
4.1 Estudo *in silico* dos genes de *CHS* 28
4.2 Perfil de expressão dos genes *CHSA* e *CHSB* em *H. armigera* 33
4.3 Integridade das moléculas de dsRNA a serem administradas nos insetos. 35
4.4 Bioensaios 35
4.4.1 Administração do dsRNA na dieta do inseto 35
4.4.2 Administração do dsRNA por aplicação tópica 37
4.5 Fenótipos após o tratamento com RNAi 38
4.6 Análise de expressão gênica após o tratamento com dsRNAs 40
4.7 Avaliação do peso dos insetos após o tratamento 42

5. DISCUSSÃO 45
6. Referências 53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos econômicos

O agronegócio vem demostrando nos últimos anos ter grande importância para o desenvolvimento do Brasil, destacando-se sua influência no setor econômico e social (BUAINAIN et al., 2014). Segundo dados do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA), no ano de 2019, o agronegócio respondeu por um quinto das operações comerciais do Brasil. Neste ano, o Produto Interno Bruto – PIB do setor foi de R$ 1,55 trilhão, representando 21,4% do PIB total brasileiro. Sendo a maior parcela associada ao ramo agrícola, que corresponde a 68% (R$ 1,06 trilhão) e a pecuária que corresponde a 32% (R$ 494,8 bilhões) (CEPEA, 2020). Assim, o agronegócio apresenta-se como um dos segmentos mais competitivos e eficientes do Brasil no cenário mundial, sendo o país o terceiro maior exportador agrícola.

Ao longo dos últimos anos, foi feito um alto investimento tecnológico no setor do agronegócio, apesar disso, este setor sofreu perdas econômicas substanciais em razão de pragas (LOPES-DA-SILVA et al., 2014).

No Brasil a política fitossanitária é desenvolvida juntamente ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e são direcionadas à saúde das culturas, ligada ao desenvolvimento científico e a transparência das leis vigentes. Entretanto, o Decreto nº 24.114 de 1934, ligado à política fitossanitária nacional, carece de uma revisão urgente, por estar desconexo, em vários aspectos, da realidade da agricultura nacional. Em virtude disso, os prejuízos provocados por pragas, no Brasil, ainda são grandes (BRASIL, 1934; RANGEL, 2015).

Na safra 2016/17, os produtores de soja tiveram despesas enormes com fungicidas, chegando a R$ 8,3 bilhões, onde 96% do valor total, foram para controle da ferrugem da soja. O prejuízo com inseticidas e herbicidas utilizados com a cultura de soja chegou aos R$ 6,2 e R$ 4,8 bilhões, respectivamente, totalizando uma perda de R$ 19,3 bilhões. O custo total com controle na produção de soja no Brasil chegou a um valor correspondente a 16,5% na safra (CEPEA 2019).

Para a cultura de milho, na temporada 2016/17 (primeira e segunda safras), o custo com fungicidas, inseticidas e herbicidas para os produtores foi de R$ 1,28 bilhão, R$ 1,42 bilhão e R$ 1,53 bilhão, respectivamente, totalizando um gasto de R$ 4,23 bilhões, ou 9% do custo total para a produção de milho no Brasil (CEPEA 2019).

A safra de 2016/17 de algodão, por sua vez, apresentou custo tão grandes quanto as safras de soja e milho. Neste caso, os prejuízos dos produtores com defensivos agrícolas foram de R$ 300 milhões com fungicidas, R$ 1,2 bilhão em inseticidas e R$ 500 milhões com herbicidas, totalizando R$ 2 bilhões de prejuízos, correspondente a 27% do total de custos da produção do algodão brasileiro nessa safra, cuja área cultivada foi de 940 mil hectares (CEPEA 2019).

De modo geral, as pragas e doenças que podem acometer diversas culturas agrícolas podem causar a redução do volume da produção, além de prejuízos à qualidade e garantia de sobrevivência dos cultivos, ocasionando em graves perdas econômicas. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias de baixo custo operacional, ecologicamente viável e que possibilite a complementação ou substituição dos métodos de controle químico, visando a contenção de pernas econômicas.

1.2 *Helicoverpa armigera*

1.2.2 Características bioecológicas de *H. armigera*

Composto por 18 espécies, o gênero *Helicoverpa* (Hardwick 1965) (Lepidoptera: Noctuidae) está distribuído de forma cosmopolita. Neste grupo está contido alguns dos insetos-praga mais destruidores de culturas agrícolas no mundo. E dentre tais espécies, a *Helicoverpa armigera* é apontada como a praga agrícola mais distribuída geograficamente pelo mundo, causando assim os maiores prejuízos econômicos dentro deste gênero (BEHERE et al., 2007; THOMAZONI et al., 2013).

H. armigera apresenta em seu desenvolvimento biológico uma metamorfose completa, seu ciclo de vida compreende as fases de ovo, lagarta, pupa até chegar a fase adulta, onde adquire maturidade reprodutiva, sendo assim, classificada com um inseto holometábolo (ALI; CHOUDHURY, 2009; ÁVILA et al., 2013) (Figura 1). O

período de ovo até a emergência em adulto dura em torno de 30 a 60 dias, podendo variar principalmente de acordo com a alimentação e condições climáticas (JAYARAJ, 1981; GUEDES et al., 2013).

Algumas características fisiológicas deste inseto influenciam diretamente no seu potencial como uma praga agrícola. *H. armígera* é descrita como uma espécie altamente polífaga, logo, possui a capacidade de se alimentar de uma ampla variedade de espécies vegetais. As lagartas já foram registradas em mais de 150 diferentes espécies vegetais, se alimentando tanto da porção vegetativa quanto da reprodutiva, causando assim danos irreversíveis a planta hospedeira (FITT, 1989; CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2014).

Além disso, as mariposas possuem alta capacidade de dispersão. Farrow e Daly (1987), descreveram três tipos de movimentações distintas. O movimento curto ou trivial, com alcance de até 1 km de distância e que tem como motivação a alimentação, o acasalamento ou a oviposição. O movimento longo, com alcance de 1 a 10 km de distância, influenciados principalmente pela velocidade do vento; incluindo movimentação entre plantações, locais de oviposição e emergência de larvas em diferentes hospedeiros vegetais. O movimento de dispersão pode alcançar centenas de quilômetros de distância, influenciados principalmente pela altitude, velocidade do vento e tempo de voo. Este tipo de movimentação ocorre, via de regra, em condições locais desfavoráveis à sobrevivência, como carência de alimento e condições climáticas adversas (FITT, 1989). Na fase de adulto, a elevada taxa de reprodução e em condições climáticas e alimentares favoráveis podem chegar até 11 gerações por ano (NASERI et al., 2011; REED, 1965).

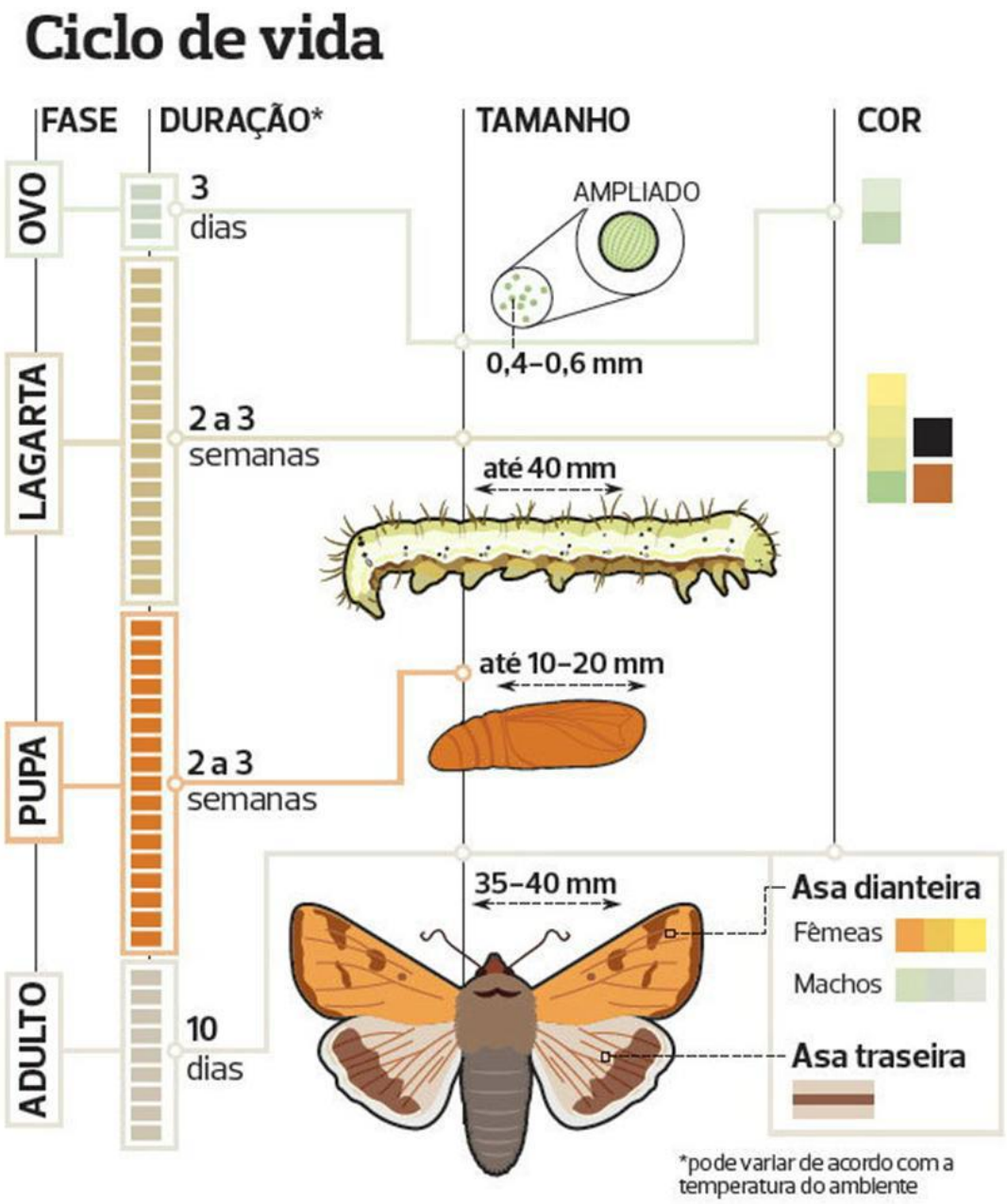


Figura 1. Aspectos biológicos de *Helicoverpa armigera*. Fonte: Modificado de ABAPA, 2014.

1.2.2 Ovo

Os ovos de *H. armigera* apresentam formato oval com a base achatada e superfície com estrias longitudinais e transversais. Logo após a postura apresentam aspecto brilhante e coloração variando do branco ao amarelado. Próximo ao período de eclosão das larvas, a coloração do ovo tende a variar para o marrom escuro (Figura

2). O tempo de incubação é de aproximadamente 3 dias e medindo entre 0,42 a 0,60 mm de comprimento e 0,40 a 0,55 mm de largura (ALI; CHOUDHURY, 2009).

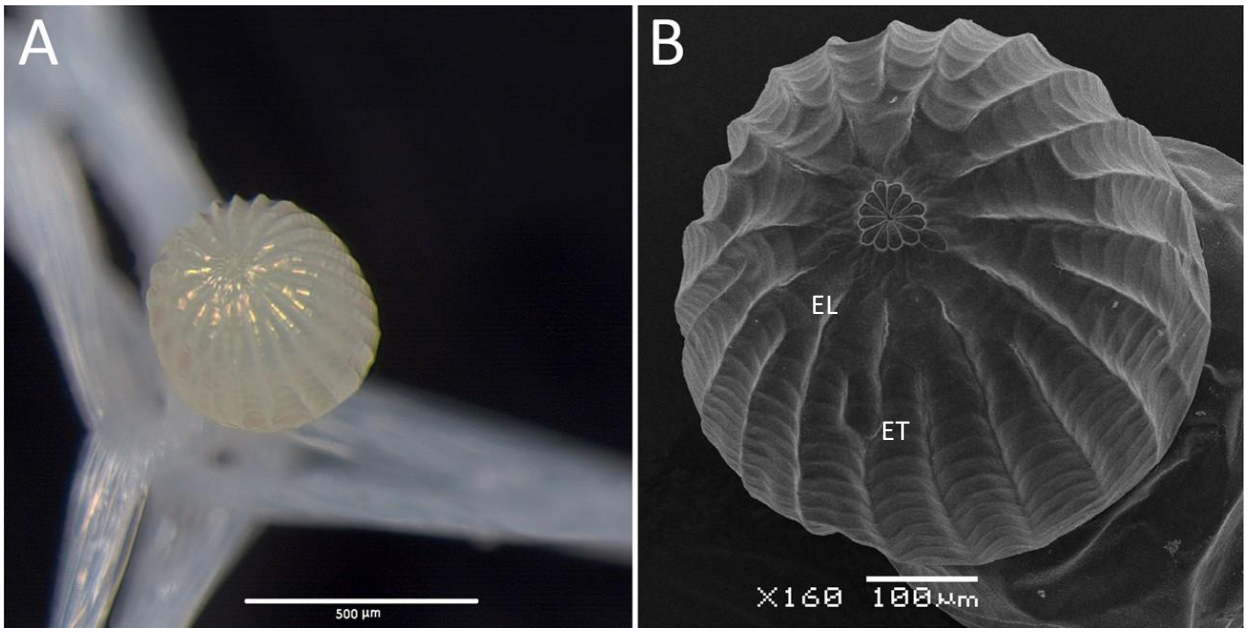


Figura 2. Microscopia de ovos de *Helicoverpa armigera*. A. Ovo recém eclodido com aspecto brilhante. B. Ovo em vista dorsal. *ET* estrias transversais, *EL* estrias longitudinais. Fonte: modificado de QUEIROZ-SANTOS et al. (2018).

1.2.3 Estádios Larvais

O estágio de larva é composto por 5 ou 6 estádios, com duração variando entre 2 e 3 semanas. O sexto estádio de desenvolvimento da larva pode não ocorrer devido a condições climáticas e alimentares desfavoráveis, e nesta última fase, a lagarta mede cerca de 30 a 40 mm de comprimento e sua coloração pode variar do verde ao amarelo claro, marrom avermelhado ou preto (CZEPAC et al., 2013; EPPO, 1981) (Figura 3).

As larvas de 1º e 2º estádios apresentam coloração que variam de branco-amarelada a marrom-avermelhado e cápsula encefálica escura. Neste período as larvas se movimentam pouco e medem de 1,2 a 5,0 mm. Conforme seu crescimento, as larvas podem apresentar uma variabilidade de coloração, podendo sua alimentação influenciar também na cor adquirida (ALI; CHOUDHURY, 2009).

Figura 3. Variação na coloração das lagartas da espécie *H. armigera*. Fonte: Modificado de SILVA (2017).

A partir do 4º estádio, uma característica, bem marcante, é observada com a presença de tubérculos abdominais escuros na região dorsal do 1º segmento abdominal em forma de semicírculo (Fig. 4), sendo assim possível diferenciar a *H. armigera* de outras espécies de lagartas fisiologicamente parecidas (MATTHEWS, 1999). Além disso, algumas características são peculiares desta espécie como: cápsula encefálica de cor parda clara, linhas laterais brancas e finas, presença de pelos, além de tegumento com textura levemente coriáceo (ÁVILA et al., 2013; CZEPAK et al., 2013).

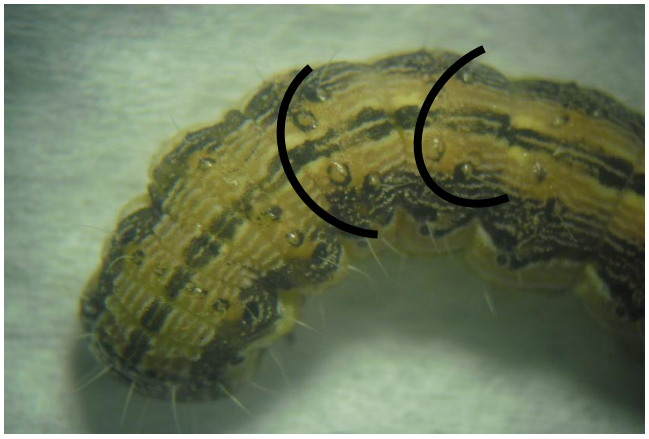


Figura 4. Tubérculo abdominal organizado em forma de semicírculo como indicado na figura em preto. Fonte: Modificado de Silva, 2017.

1.2.4 Pupa

Chegando ao último estádio de larva, as lagartas interrompem a alimentação e geralmente se deslocam ao solo onde buscam condições de temperatura e umidade ideais para avançar ao estágio de pupa. O estágio inicial, também conhecido como pré-pupa, apresenta coloração verde-clara e após esclerotização de seu tegumento adquire a coloração marrom (Figura 5). O comprimento varia de 14 a 18 mm, seu formato é obtecta com extremidades arredondadas tanto na região anterior quanto na posterior. A duração desta fase varia de 10 a 14 dias, entretanto em condições climáticas desfavoráveis pode ocorrer a diapausa como forma de sobrevivência (ALI; CHOUDHURY, 2009; KARIM, 2000). Na fase de pupa já é possível observar um dimorfismo sexual pela observação da genitália externa (ARAÚJO, 1990).

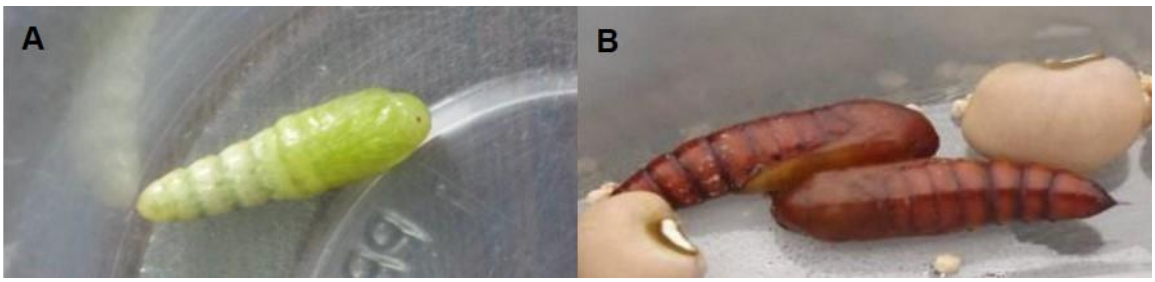


Figura 5. Pupas de *H. armigera* em diferentes etapas de formação: (A) Pupa recém-formada; (B) Pupa após 24h da transformação. Fonte: Modificado de Silva, 2017.

1.2.5 Adulto

As mariposas de *H. armigera* apresentam proeminente dimorfismo sexual, sendo possível distinguir o macho da fêmea pelo tamanho e coloração das asas. Os machos possuem a envergadura e comprimento de aproximadamente 35 e 14 mm, respectivamente, e coloração cinza-esverdeada. Já as fêmeas possuem envergadura e comprimento de aproximadamente 40 e 18 mm, respectivamente e coloração castanho-alaranjado. (ALI; CHOUDHURY, 2009) (figura 6).

As asas anteriores possuem margem que apresenta uma linha com sete a oito manchas, seguida de faixa transversal mais clara. As asas posteriores são de coloração clara e borda na extremidade apical escura (ARAÚJO, 1990).

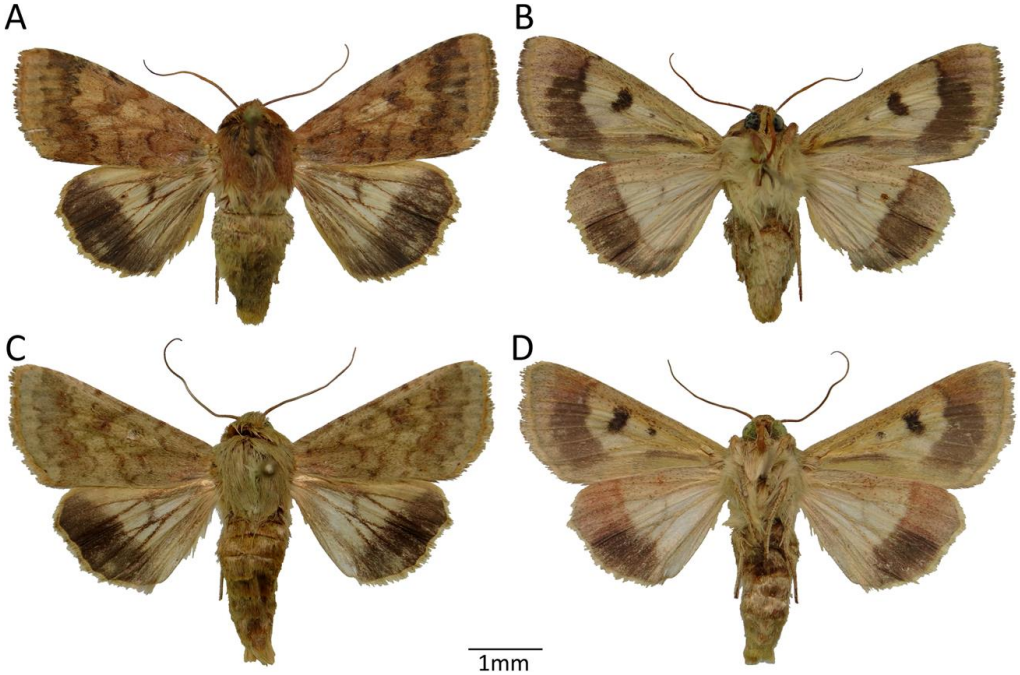


Figura 6. Adultos de *H. armigera*: (A) fêmea em vista dorsal. (B) Fêmea em vista ventral. (C) Macho em vista dorsal. (D) macho em vista ventral. Fonte: Modificado QUEIROZ-SANTOS et al. (2018).

O tempo de vida médio de machos e fêmeas na fase adulta é de 9,2 e 11,7 dias, respectivamente, (ALI; CHOUDHURY, 2009). O néctar de flores é um importante atrativo para mariposas da espécie *H. armigera*, dessa forma, este recurso é importante na escolha do vegetal hospedeiro, podendo inclusive influenciar na capacidade de oviposição (CUNNINGHAM, 1999). No período de oviposição, que dura cerca de 5 dias, as fêmeas desta espécie são capazes de produzir até 3000 ovos (REED, 1965; NASERI et al., 2011).

1.3 Ocorrência e prejuízos econômicos relacionados à *Helicoverpa armigera*

Segundo dados do Centro Internacional para Agricultura e Biociências (CABI) 26 países apresentam a espécie de *H. armigera* de forma amplamente distribuída em seu território. Na África: Argélia, Líbia, Egito Zimbábue e África do Sul; na Europa: Portugal, Espanha, Albânia, Grécia, Romênia, Chipre e Ucrânia; na Ásia: Israel, Síria, Arábia Saudita, Iémen, Iran, Tajiquistão, Índia, Bangladesh, Laos, Japão e China (em

7 microrregiões); e na Oceania: Austrália, Nova Caledônia e Nova Zelândia. Além disso, o CABI aponta ocorrências reportadas desta espécie em todos os continentes, em diversos países e microrregiões (CABI, 2020) (figura 7).

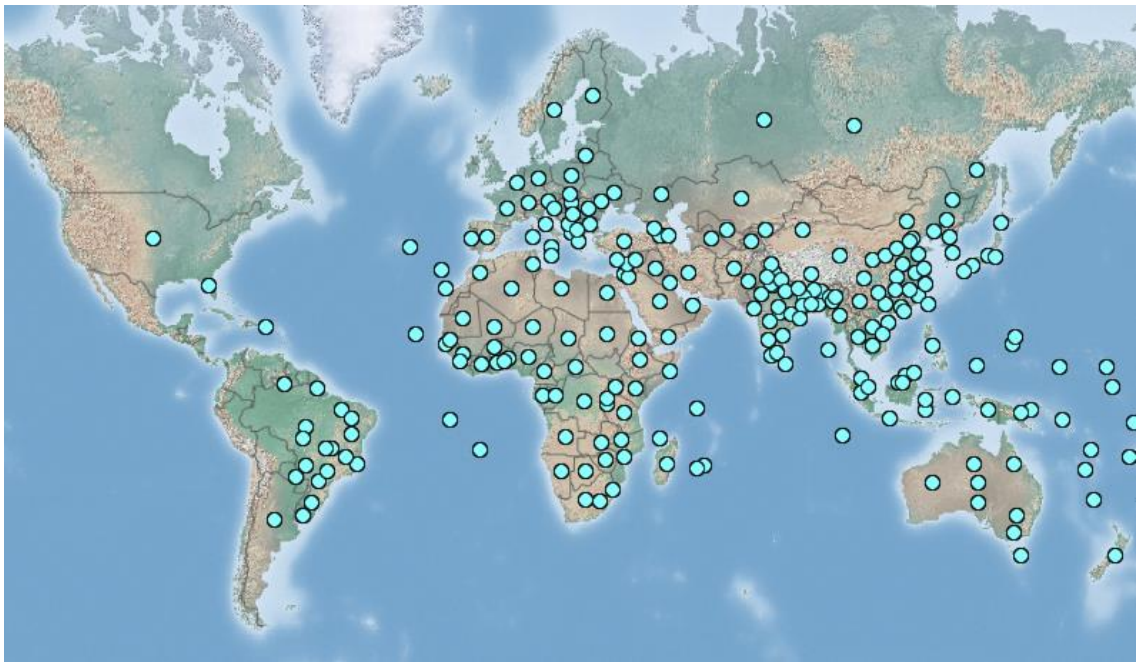


Figura 7. Distribuição de ocorrências reportadas de *H. armigera* a nível global. Fonte: Modificado de CABI, 2020.

Até o ano de 2012 apenas o continente americano não havia reportado perdas econômicas relacionadas à espécie *H. armigera*. A primeira ocorrência da praga foi no estado da Bahia, Brasil, em 2012, os ataques desta espécie foram registrados nas culturas de soja, milho e algodão. Nesta última, a perda da produção chegou a 80%, principalmente pela dificuldade no manejo da praga, em função da ausência de inseticidas licenciados para seu controle (CZEPAK et al., 2013; TAY et al., 2013). No ano seguinte Uruguai e Paraguai registraram a ocorrência da espécie em seu território (ARNEMANN et al. 2016; SENAVE, 2013). Em 2014, Múrua e colaboradores, identificaram mariposas em armadilhas de feromônio em lavouras de grão-de-bico na Argentina (MÚRUA et al, 2014), ainda neste ano, foi confirmado por técnica de biologia molecular a ocorrência de um indivíduo adulto em San Germán, Porto Rico (Smith, 2014).

A chegada da *H. armigera* na América do Sul e consequentemente a região caribenha foi vista com preocupação pelos Estados Unidos (EUA). Um estudo feito por Gilligan e colaboradores (2019) analisou larvas interceptadas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) em *commodities* importadas, em diferentes portos do país. No período de 2014 a 2016, um total de 248 amostras foram coletadas e as análises de identificação molecular mostraram que 44 delas foram positivas para *H. armigera*. Neste estudo, ainda fica implícito a possibilidade de subnotificação em países como Colômbia, República Dominicana e Peru, exportadores dos grãos em que as amostras foram confirmadas como *H. armigera,* uma vez, que até a data de coletada das amostras, não havia a documentação formal da espécie em nenhum destes países (GILLIGAN et al, 2019).

Outro estudo feito por Kriticos e colaboradores, no início de 2015, avaliou o potencial de distribuição da espécie *H. armigera* na chegada ao território dos EUA. Nessa análise foram realizadas modelagens climáticas com o programa CLIMEX, que incluem variações de temperatura, influência de umidade em regiões irrigadas, e distância geográfica das principais culturas que potencialmente seriam atingidas pela praga. O estudo concluiu que 65% da área cultivada dos EUA estaria em condições ótimas para o estabelecimento do inseto, esta área cultivada equivale a 843 milhões de dólares por ano em produção (KRITICUS et al, 2019). Apesar de todas as precauções consideradas, em 2015, o Departamento de Agricultura da Florida identificou três mariposas neste estado, duas em armadilhas de feromônio em cultura de tomate e a terceira próximo a um parque, ambos os casos na cidade de Brandenton (EL-LISSY, 2015; HAYDEN; BRAMBILA 2015).

Os prejuízos gerados pela *H. armigera* em culturas agrícolas estão diretamente relacionados com a dieta do inseto na fase larval, as lagartas se alimentam tanto da porção vegetativa, quanto reprodutiva de diferentes culturas, podendo causar danos irreversíveis ao hospedeiro vegetal. Estima-se que os custos anuais relacionados com perdas de produção e controle da *H. armígera* cheguem a US$ 5 bilhões de dólares em todo mundo (ÁVILA et al., 2013; LAMMERS; MACLEOD, 2007). Estima-se que na safra brasileira de 2012/2013 os prejuízos foram de 2 bilhões de dólares com perda direta de produtividade e gastos relacionados com o controle da praga, principalmente nas culturas de soja, milho e algodão (LEITE, 2014).

1.4 Controle de *Helicoverpa armigera*

O controle efetivo de insetos é uma tarefa complexa, pois não existe um protocolo padrão que possa ser aplicado para as diferentes populações de insetos as quais se deseja realizar o manejo. Por isso, é necessário dispor do máximo de estratégias de controle para que a execução seja integrada, seletiva, econômica e adequada à realidade de cada região. Procedimento racional, para o controle seletivo deve ter como alvo uma particularidade fisiológica do inseto, de preferência não encontrada em plantas e mamíferos hospedeiros (Braga & Valle, 2007).

O primeiro passo para o controle de uma praga é seu monitoramento populacional, a partir disso, é possível determinar a época de ocorrência e os picos populacionais, sendo assim uma importante ferramenta na definição da intensidade dos prováveis períodos de infestação e perdas econômicas (ALUJA, 1994). Este método é conhecido como controle comportamental, e consiste em técnicas que alteram o comportamento dos insetos objetivando a diminuição das populações. Neste tipo de controle, o mecanismo principal se baseia na utilização de semioquímicos, que podem atrair ou repelir os insetos. Um exemplo prático deste método são as armadilhas de feromônio sexual, que atraem os insetos, sendo assim possível realizar seu monitoramento (COSTA et al., 2008). Esta técnica é aplicada no controle de *H. armigera*, com a utilização de feromônio sexual que promove a desorientação do inseto macho adulto, dificultando assim o encontro com a fêmea para o acasalamento (CZEPAK et al., 2013).

Outro conjunto de métodos que vem ganhando espaço no sentido de controle de pragas é o controle biológico. Segundo Parra e colaboradores (2002), o controle biológico pode ser definido como um fenômeno que regula a população de um determinado organismo por meio de um inimigo natural. Este tipo de controle tem sido considerado vantajoso sendo adotado dentro do contexto de Manejo Integrado de Pragas (MIP), no qual os aspectos ecológicos, econômicos, toxicológicos e sociais são considerados para tomada de decisão no controle (Silva et al., 2009a). Alguns exemplos de organismos utilizados no controle biológico da *H. armigera* são:

• Insetos predadores: Na Índia, mais de 60 espécies de predadores, pincipalmente os da família Chrysopidae (ordem Neuroptera), foram documentados estando associados a predação de *H. armigera* na fase larval (ROMEIS; SHANOWER, 1996).

• Insetos parasitoides: O gênero *Trichogramma*, composto por pequenas vespas, apresentam grande associação no parasitismo de ovos de diversas espécies de insetos, incluindo *H. armigera*. Esses parasitoides foram lançados em diversas culturas em programas de controle biológico de espécies de *Helicoverpa* (AVILA et al., 2013).

• Fungos: Em um estudo feito por Agostini (2014) a eficiência dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* foi testada no controle de *H. armigera* através dos produtos comerciais Boveril® PM e Metarril® PM, que respectivamente apresentam tais fungos como ingredientes ativos. Além disso, o fungo *Nomuraea rileyi*, que foi isolado de insetos mortos também foi testado. Como resultado foi observado mortalidade de 56%, 39% e 34% respectivamente.

• Bactérias: Atualmente, o *Bacillus thuringiensis* se caracteriza como o melhor exemplo de sucesso de bactéria associada ao controle de insetos praga. Até a presente data, 18 diferentes produtos biológicos são liberados pelo Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle de *H. armigera* (AGROFIT/MAPA, 2020) (Tabela 1).

• Nematoides: Em um trabalho feito por Machado e colaboradores (2015) uma seleção de parasitas obrigatórios foi avaliada no controle de pupas de *H. armigera*, quatro populações do gênero *Heterorhabditis* foram utilizadas na concentração de 200 JI/mL. Como resultado, observou-se mortalidade variando entre 25 e 35%.

• Vírus: A família *Baculoviridae* exemplifica o uso de vírus no controle de insetos-praga. Costa (2015) avaliou a eficiência dos isolados de baculovírus HearNPV-BR1, HearNPV-BR2, HearNPV-BR3, SfNPV- BR4 e o produto comercial Gemstar®, no controle de lagartas de 3º estádio de *H. armigera*. Os resultados obtidos foram muito promissores, pois todos os isolados do vírus foram capazes de infectar as larvas e causar morte em até dez dias.

O controle da *H. armigera* vem sendo feito principalmente com o uso de inseticidas químicos, entretanto, a resistência a inseticidas convencionais como hidrocarbonetos clorados, piretróides sintéticos e organofosforados já foi descrita na literatura em diversos países incluindo Paquistão, China, Austrália, e África do Sul (FORRESTER et al., 1993; RUI et al., 1999; AHMAD et al., 2002; MARTIN et al., 2003).

Em comparação a outros insetos-praga, a *H. armigera* se diferencia por sua capacidade de resistência aos produtos químicos utilizados em seu controle. Para obter uma ação efetiva, a dosagem desses produtos geralmente é bastante elevada, refletindo um aumento do custo da produção agrícola bem como em potencial dano ambiental. Quando utilizado de forma indiscriminada, os inseticidas químicos promovem altos níveis de resistência em insetos. Além do mais, podem atingir inimigos naturais ou espécies não alvo encontrados na região de aplicação, por possuírem baixo grau de seletividade. (FROZZA, 2013).

No Brasil, a *H. armigera* era considerada uma praga quarentenária, deste modo, não existia nenhum produto registrado para seu controle em sua primeira ocorrência. Este fato ocasionou a autorização emergencial de alguns produtos para controle, estes permaneceram autorizados até março de 2016 (BRASIL, 2013). Atualmente, o MAPA mantém 32 formulações, de produtos biológicos e químicos, autorizadas para o controle desta praga (AGROFIT/MAPA, 2020) (Tabela 1).

Tabela 1. Ingredientes ativos de produtos autorizados pelo MAPA para controle de *H. armigera*

Ingrediente ativo	Grupamento químico	Número de produtos
Bacillus thuringiensis	Produto microbiológico	18
Baculovirus	Produto microbiológico	5
VPN-HzSNPV	Produto microbiológico	4
AcMNPV	Produto microbiológico	2
Isaria fumosorosea	Produto microbiológico	2

(Z)- 11- hexadecenal	Aldeído	2
Acetato de (Z)-11-hexadecenila	Acetato Insaturado	1
Abamectina	Avermectina	2
Abamectina + Clorantraniliprole	Avermectina + antranilamida	2
Acefato	Organofosforado	4
Benzoato de Emamectina	Avermectina	1
Clorfenapir	Análogo de pirazol	3
Clorantraniliprole	Antranilamida	2
Clorantraniliprole + lambda-cialotrina	Antranilamida + piretróide	1
Clorfluazurom	Benzoiluréia	2
Ciantraniliprole	Antranilamida	2
Clorpirifós	Organofosforado	1
Diflubenzurom	Benzoiluréia	1
Espinetoram	Espinosinas	1
Espinosade	Espinosinas	1
Flubendiamida	Diamida do ácido ftálico	2
Imidacloprido + tiodicarbe	Neonicotinóide + metilcarbamato de oxima	1
Indoxacarbe	Oxadiazina	1
Indoxacarbe + novaluron	Oxadiazina + benzoiluréia	1

Lufenurom + tiodicarbe	Benzoiluréia + metilcarbamato de oxima	1
Metaflimizona	Semicarbazone	2
Metomil + novalurom	Metilcarbamato de oxima + benzoiluréia	1
Metoxifenozida	Diacilhidrazina	1
Metoxifenozida + espinetoram	Diacilhidrazina + espinosinas	3
Teflubenzurom	Benzoiluréia	3
Tiodicarbe	Metilcarbamato de oxima	7
Zeta-cipermetrina	Piretróide	1

No sentido de controle de praga, novas estratégias vêm sendo estudadas e o RNA de interferência (RNAi) destaca-se na literatura como uma promissora técnica para auxiliar os métodos tradicionais de combate a insetos-praga. (BAUM et al., 2007; PRICE; GATEHOUSE, 2008; HUVENNE; SMAGGHE, 2010; XUE et al., 2012; NARVA et al., 2013; CHRISTIAENS et al., 2016).

1.5 RNA de interferência como ferramenta de controle de insetos

O RNAi é um mecanismo altamente conservado descrito em eucariotos como responsável pela regulação pós-transcricional, controlando a expressão de um gene, a nível de mRNA, em células. Moléculas de dupla fita de RNA (dsRNA) são geralmente as responsáveis pelo desencadeamento deste mecanismo de silenciamento gênico (Fire et al., 1998; Carthew e Sontheimer, 2009).

Resumidamente, o mecanismo de RNAi inicia-se com a presença no citoplasma de uma molécula de dsRNA, podendo esta ser exógena ou endógena, respectivamente, inserida na célula ou sintetizada pela mesma, geralmente em

processo de regulação pós-transcricional. A molécula de dsRNA é então clivada por uma enzima RNAse do tipo III conhecida como Dicer, em pequenos fragmentos de duplas fitas de RNA, de 26 nucleotídeos, os chamados siRNAs (do inglês *short interfering* RNA), em seguida as fitas do siRNA são desacopladas, e a fita anti-senso é removida e degradada, a senso também conhecida como fita guia é incorporada ao complexo RISC (do inglês - RNA *induced silencing complex*), que é o complexo de proteínas responsável pela degradação do RNA mensageiro (mRNA). Por fim, a fita guia reconhece o mRNA por complementariedade, levando a sua degradação pelo complexo RISC, dessa forma diminuindo a expressão de uma determinada proteína por consequência (SEMIZAROV et al., 2003; MEISTER; TUSCHL, 2004; LEE et al., 2004) (Figura 8).

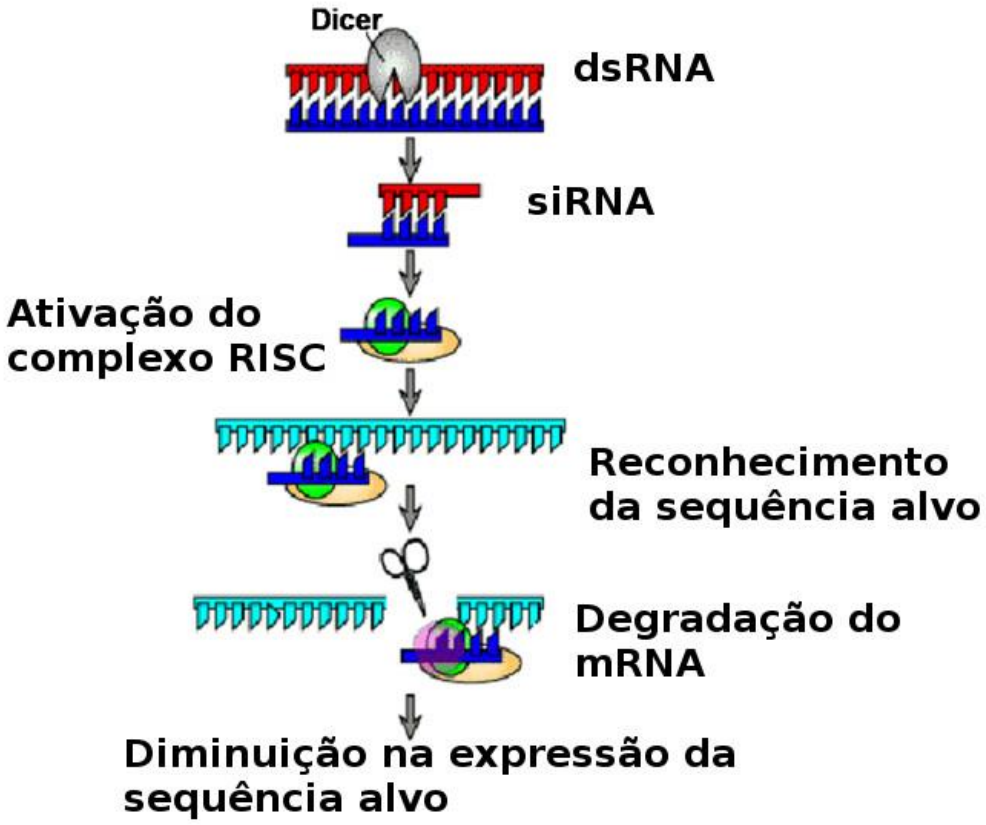


Figura 8. Esquema geral do mecanismo de RNAi. Modificado de Christine Antler, 2008.

Alguns mecanismos de RNAi já caracterizados são: piwi RNA que interagem com proteínas PIWI (piRNA), microRNA (miRNA) e pequenos RNA interferentes (small inferfering RNA, siRNA) (JOGA et al, 2016). A biossíntese destas moléculas e sua interação com as proteínas argonautas são critérios utilizados para sua classificação (KIM e HAN, 2009).

Estudos recentes vêm buscando utilizar o RNAi como uma ferramenta no auxílio do controle de pragas (PRICE; GATEHOUSE, 2008). O mecanismo de ação principal baseia-se, geralmente, na administração de dsRNA na alimentação do organismo alvo, para que através da ingestão se inicie o processo de silenciamento gênico, por meio da degradação de mRNAs homólogos e por fim diminuindo a síntese da proteína correspondente. Esse processo em muitos casos gera danos fisiológicos importantes ou até mesmo a morte do organismo alvo (MEISTER; TUSCHL, 2004; KOLA et al., 2015).

A utilização de plantas geneticamente modificadas que expressam dsRNA também vem sendo muito explorada como ferramenta de controle de insetos-praga. O primeiro artigo, neste sentido foi descrito por Baum e colaboradores (2007), nesse trabalho foi utilizado milho geneticamente modificado para expressar dsRNA do gene ATPase vacuolar (V-ATPase). Foi observado que as plantas transgênicas capazes de expressar o dsRNA de V-ATPase sofreram menos danos quando atacadas por larvas de *Diabrotica virgifera* do que as plantas não transgênicas.

O primeiro exemplo de uma planta resistente comercial que utiliza o mecanismo de RNAi é o híbrido de milho geneticamente modificado SmartStax Pro®, lançado em 2017 pela empresa Monsanto (atualmente Bayer/Monsanto). Este cultivar expressa dsRNA do gene Snf7 (proteína vacuolar essencial), apresentando resistência às larvas do besouro *D. virgifera* (Zhang et al., 2017).

A escolha de alvos moleculares é um dos pontos mais importantes na utilização da técnica de RNAi, pois é primordial que seja eficaz contra o organismo alvo, do mesmo modo, não apresente toxicidade em mamíferos e em insetos não alvo, e no caso de produções agrícolas, não ocasione perdas de produtividade na cultura em questão (KOLA et al., 2015).

Acompanhando uma tendência mundial, um importante passo foi dado pelo governo brasileiro a fim de regulamentar a técnica de RNAi. Uma normativa da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) foi publicada no início de 2018, no texto da normativa, o órgão define a tecnologia de RNAI como um método que não envolve transgenia, e dessa forma o classifica com uma Técnica Inovadora de Melhoramento de Precisão (TIMP). Com isso, a tecnologia empregada não estará sujeita à critérios os quais um organismo geneticamente modificado é sujeito à aprovação (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2018; VASCONCELOS, 2018).

1.6 Quitina sintase como alvo molecular de silenciamento gênico

O sucesso evolutivo dos insetos é atribuído ao desenvolvimento da cutícula, que é um exoesqueleto complexo com diversas funções. Os principais componentes estruturais da cutícula são a quitina, diversas proteínas cuticulares, lipídios, catecolaminas e minerais (Zhu et al., 2016). O exoesqueleto suporta a ligação muscular para locomoção, evita danos físicos e químicos e protege o inseto contra doenças infecciosas e perda de água (Zhu et al., 2016).

A quitina é o polímero mais abundante em inseto, sendo composto de unidades de N-acetilglicosamina com ligações β (1-4). Este homopolímero está presente em estruturas extracelulares, na cutícula (exoesqueleto), na matriz peritrófica (MP) localizada em intestino médio e na casca de ovos de insetos (NEVILLE et al., 1976; TIMMERMANN & BRIEGEL, 1999; TELLAM et al., 2000; ARAKANE et al., 2004; ARAKANE et al., 2005; MOREIRA et al., 2007, MANSUR et al, 2014). Além disso, é bem conhecido que a quitina compõe exoesqueleto de fungos e artrópodes, e não está presente em vertebrados e plantas (ZIMOCH et al., 2005). A quitina também é constituinte de traqueias, glândulas salivares e do aparelho sugador de insetos (TELLAM et al., 2000, KRAMER & MUTHUKRISHNAN, 2005). O exoesqueleto é composto principalmente de proteínas e quitina, conferindo principalmente proteção mecânica e impedindo a desidratação dos insetos. Na cutícula dos insetos o conteúdo de quitina varia de 30 a 40 % da massa seca, dependendo da espécie (RICHARDS, 1978; KRAMER et al., 1995).

A MP é uma estrutura constituída por quitina, proteínas e proteoglicanos (JACOBS-LORENA et al., 1996). A MP presente nos insetos pode ser classificada em tipo I e II, dependendo do local de síntese (WIGGLESWORTH,1930; PETERS, 1992). A MP do tipo I, em geral, é sintetizada pelas células epiteliais do intestino médio de insetos adultos em resposta à ingestão de sangue; a do tipo II, em geral, é sintetizada constantemente pela cárdia, órgão localizado na região anterior ao intestino médio em larvas (PETERS, 1992; LEHANE, 1997). No entanto, algumas espécies de insetos apresentam o mesmo tipo PM em ambos os estágios, como em *Glossina spp* e *Stomoxys calcitrans*, que apresentam apenas PM do tipo II (LEHANE, 1976).

A quitina também é componente de ovário e ovos de inseto (ARAKANE et al, 2008), e está intimamente relacionada com a viabilidade dos ovos nas espécies *Aedes aegypti* e *Rhodnius prolixus* (MOREIRA et. al., 2007; MANSUR et.al., 2010; MANSUR et.al., 2014).

A via de biossíntese de quitina tem início com a produção de glicose por meio da quebra da trealose, presente na hemolinfa, pela enzima trealase (EC3.2.1.28). Esta enzima está distribuída de forma ampla nos tecidos dos insetos como a epiderme e intestino (MERZENDORFER & ZIMOCH, 2003). A conversão de glicose em frutose-6-fosfato é feita por duas enzimas da via glicolítica, a hexoquinase e a glicose-6-fosfato isomerase. Em seguida a glicose-6-fosfato é convertida em glicosamina-6-fosfato pela enzima glicosamina-6-fosfato transferase (GFAT). A glicosamina-6-fosfato sofre a ação da enzima glicosamina-6-P-N-acetiltransferase, gerando N-acetilglicosamina-6-P. Esta sofre a ação de uma mutase e gera N-acetilglicosamina-1-P que será convertida em UDP-N-acetilglicosamina. O último passo da via de biossíntese é catalisado pela enzima quitina sintase (CHS) (EC.2.4.1.16) que converte UDP-N-acetilglicosamina no polímero de quitina. As enzimas GFAT e CHS são consideradas os principais sítios de regulação da via de biossíntese de quitina (KRAMER & MUTHUKRISHNAN, 2005).

A quitina sintase é uma proteína de membrana integral que pertence à família das β-glicosiltransferases 2 e considerada uma enzima chave para a produção de quitina (MERZENDORFER, 2006). Em geral, a massa molecular das CHSs varia entre 150-200 kDa com ponto isoelétrico ligeiramente ácido.

Em insetos, em geral, dois genes são relacionados à síntese de quitina, o gene CHS1 ou CHSA envolvido na síntese de quitina da cutícula (TELLAM et al., 2000; ZHU et al., 2002; ARAKANE et al., 2004, 2005; MANSUR et al., 2014), de ovários e ovos de insetos (ARAKANE et al., 2004; MANSUR et al., 2014) e o outro gene CHS2 ou CHSB responsável pela síntese de quitina da PM (IBRAHIN et al., 2000; ARAKANE et al., 2004, 2005).

A técnica de RNAi tem sido bastante utilizada para investigar a função das CHSs em insetos (MANSUR et al., 2014; YU et al, 2020). Esses estudos sugerem o potencial do RNAi tendo como alvo a *CHS* para controle de insetos transmissores de doenças e os que são praga de agricultura (LOPEZ et al., 2019; ZHANG et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a utilização do RNAi, tendo como alvo de silenciamento os genes de *CHSA* e *CHSB*, como uma ferramenta de controle de larvas de *H. armigera.*

2.2 Objetivos específicos

- Buscar as sequências de transcrito de *CHSA* e *B* no banco de dados da NCBI, desenhar iniciadores para amplificação dos genes e para a síntese de dsRNA em 3 regiões gênicas distintas dos genes de *CHS*;

- Determinar o perfil de expressão gênica de dos genes de *CHSA* e *B* nos diferentes estágios de vida do inseto *H. armigera*;

- Realizar bioensaios de silenciamento dos genes de *CHSA* e *B* em lagartas pela administração de dsRNA em diferentes doses: via alimentação e por aplicação tópica;

- Avaliar o efeito do silenciamento, quantificando a expressão relativa de transcritos dos genes de *CHSA* e *B* nos insetos tratados com dsRNA, pela técnica de PCR em tempo real;

- Avaliar modificações fenotípicas ao longo do desenvolvimento de *H. armigera.*

3. METODOLOGIA

3.1 Manutenção da colônia de *H. armigera*

Os insetos em fase pré-eclosão, ovo, foram obtidos da empresa PROMIP consultoria e assessoria em agronomia LTDA e mantidos no insetário do Departamento de Bioquímica, do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro a 28 ± 2 °C de temperatura, 60 ± 10% de umidade relativa e fotoperíodo de 12:12 claro/escuro. Lagartas de *H. armigera* recém eclodidas foram alimentadas livremente com a dieta artificial proposta por Greene et al. (1976), com adaptações. Após o preparo da dieta, esta foi dividida em cubos de 5 mm^3 a serem oferecidos na alimentação das lagartas, ração pura ou embebida com dsRNA. Os insetos no 2º estádio foram individualizados em placas de Petri para evitar o canibalismo, comumente observado nessa espécie. Ao atingir o estágio de pupa, foram higienizadas com solução hipoclorito 10% e condicionadas em gaiolas cilíndricas de PVC com a parte superior coberta com tecido do tipo "*tule*". Ao emergirem em adultos, foram alimentados livremente com uma solução aquosa de mel a 10%. Geralmente, após acasalarem, as mariposas depositam seus ovos no tecido "*tule*". Assim, a solução de mel, bem como o tecido contendo os ovos foram trocadas a cada 3 dias. Os tecidos foram passados para um recipiente plástico com tampa contendo dieta, até a eclosão das lagartas.

3.2 Busca das sequências dos genes *CHSA* e *CHSB* de *H. armigera* e seleção das regiões alvo de silenciamento

Para selecionar as regiões alvo de silenciamento, o primeiro passo foi a busca das sequências proteicas e de nucleotídeos dos genes *CHSA* e *CHSB* nos respectivos bancos de dados na plataforma NCBI. As sequências encontradas foram alinhadas utilizando a ferramenta online Multalin (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalin.html) para verificar a homologia das sequências supracitadas entre si e em comparação a outros organismos.

As sequências de aminoácidos de *CHSA* (AKJ54482.1) e *CHSB* (ALL71800.1) de *H armigera* foram alinhadas com as sequências de aminoácidos de CHSA e CHSB outros insetos: *Tribolium castaneum* (AAQ62692.1 e EFA10719.1), *Drosophila melanogaster* (NP_524233.1 e NP_524209.3) e *Spodoptera exigua* (AAZ03545.1 e ACC85603.1) para identificar as sequências consensos das proteínas que incluem as sequências “QRRRW” e “EDR”, descritas como assinaturas moleculares do gene *CHS* (MERZENDORFER, 2006; NAGAHASHI et al, 1995).

Em seguida, as sequências de nucleotídeos dos genes *CHSA* (KP939100.1) e *CHSB* (KT004448.1) foram alinhadas para a seleção das regiões alvo de silenciamento e desenho dos respectivos iniciadores. Três regiões foram selecionadas como alvo, sendo duas no gene *CHSB* uma na região correspondente ao C-terminal e outra no domínio catalítico e uma no gene *CHSA* na região correspondente ao N-terminal. O critério utilizado foi selecionar duas regiões com pouca homologia entre os dois genes e uma região que contemplasse alta homologia entre as sequências como o sítio catalítico.

3.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

No intuito de extrair o RNA dos estágios de ovo, larvas (L1-6) e pupa, os diferentes *pools* de insetos foram imersos em nitrogênio líquido e macerados com auxílio de um pistilo estéril. Em seguida a extração foi feita pelo método TRizol seguido de purificação utilizando o kit Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus (Zymo Research), de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA extraído foi tratado com DNAse I (Ambion Life Technologies) com incubação por 20 minutos a 37 °C seguida da síntese de cDNA com o kit SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher), seguindo as instruções do fabricante.

3.4 Amplificação por PCR convencional

Todas as amplificações gênicas por PCR realizadas foram feitas com a enzima GoTaq Hot Start (Promega) de acordo com as instruções do fabricante e os diferentes cDNAs dos diferentes estágios do desenvolvimento foram utilizados como molde para

as reações. As amplificações foram realizadas em temociclador modelo Veriti (Applied Biosystems) com a desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, 35 ciclo de 95 °C por 30 segundos, 48 – 54 °C (variação de temperatura de anelamento dos diferentes iniciadores) por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos e a extensão final de 72 °C por 5 minutos. Após as reações de PCR, as amostras amplificadas foram reveladas com o intercalante de DNA GelRed por eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizadas em fotodocumentador (MiniBIS Pro – Bio-imaging Systems UNISCIENCE).

3.5 Análise de expressão dos genes *CHS* por PCR quantitativo

Os iniciadores desenhados tiveram suas concentrações padronizadas, assim como as diluições do cDNA, e então os cDNAs dos diferentes estágios de desenvolvimento do inseto foram utilizados para determinar os níveis de expressão dos genes de *CHS* por PCR quantitativo (qPCR). Para tanto, foi utilizado o fluoróforo SYber-Green. As reações foram feitas no termociclador StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) com o ciclo: 50 ºC por 2 minutos; 95 ºC por 10 minutos; seguido pelas etapas de desnaturação a 94 ºC por 15 segundos, anelamento em temperatura referente a cada iniciador por 15 segundos e extensão a 72 ºC por 1 minuto, em um ciclo de 40 repetições; seguidas por curva de dissociação, em condições padrões do aparelho. Os níveis de expressão foram determinados a partir do número de ciclos necessários para atingir o valor fixo de Ct (Cycle threshold). Os valores de Ct foram normalizados tendo como referência o gene alfa tubulina e então foi calculado o nível de expressão gênica relativa nas amostras usando o método ΔΔCt. Os ensaios de qPCR foram feitos de acordo com *Minimum Information Required for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) Guidelines* (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os iniciadores utilizados para as reações de qPCR estão apresentados na tabela 2, bem como o tamanho do produto amplificados com os iniciadores.

Tabela 2. Iniciadores desenhados para as reações de qPCR.

Nome do iniciador	Sequência (5' - 3')	Tamanho do amplicon
Alpha_T	(F) GTCCAACACCACCGCCATC	114 pares de base
	(R) CCCTCCTCCATACCCTCACC	
CHSA	(F) ATCCCAGAAATAGGAACACTCATT	144 pares de base
	(R) GATCAAGAAGAATAGAAGGC	
CHSB	(F) GGAGAAAGGGAAGGATACTAAA	115 pares de base
	(R) CAGGGATGGTAGGCGAGAGA	

3.6 Síntese do dsRNA

Os iniciadores desenhados (F) ATCCCAGAAATAGGAACACT (R) GATCAAGAAGAATAGAAGGC foram utilizados para amplificar a região correspondente a N-terminal da *CHSA*, os iniciadores (F) GGAGAAAGGGAAGGATACT (R) CAGGGATGGTAGGCGAGAGA foram utilizados para amplificar a região correspondente ao C-terminal da *CHSB* e os iniciadores (F) TTGCTGGCTTTGGATGGTG (R) ATAATGTCGGGCTTCGTGAGA foram utilizados para amplificar a região correspondente ao sítio catalítico do gene *CHSB*. Como molde da reação de PCR foi utilizado uma mistura dos cDNAs dos diferentes estágios de desenvolvimento em partes iguais. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5%, os fragmentos correspondentes foram removidos do gel e purificados com o kit QIAquick gel extraction (QIAGEN). Em seguida os produtos purificados serviram como molde para uma segunda amplificação por técnica de PCR, utilizando dessa vez os iniciadores descritos acima contendo os promotores T7. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5% e purificados

conforme a primeira reação. Os produtos contendo o promotor T7 foram dosados e 1µg de cada foi utilizado para a síntese dos dsRNAs com o kit T7 RiboMAX (Promega) seguindo as instruções do fabricante e em seguida a integridade das moléculas de dsRNA foi observada em gel de agarose 1,5%. Os iniciadores utilizados tanto para a amplificação das regiões alvo, quanto para amplificação dos produtos contendo os promotores T7 que serviram como molde para a síntese dos dsRNAs estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para amplificação das regiões alvo de silenciamento e síntese dos dsRNAs.

Nome do iniciador	Sequência (5' - 3')	Tamanho do amplicon
CHSA	(F) ATCCCAGAAATAGGAACACT	144 pares de base
	(R) GATCAAGAAGAATAGAAGGC	
CHSB	(F) GGAGAAAGGGAAGGATACT	115 pares de base
	(R) CAGGGATGGTAGGCGAGAGA	
CHSAB	(F) TTGCTGGCTTTGGATGGTG	306 pares de base
	(R) ATAATGTCGGGCTTCGTGAGA	
dsRNA_A	(F) TAATACGACTCACTATAGGGATCCCAGAAATAGGAACACT	144 pares de base
	(R)TAATACGACTCACTATAGGGGATCAAGAAGAATAGAAGGC	
dsRNA_B	(F)TAATACGACTCACTATAGGGGGAGAAAGGGAAGGATACT	115 pares de base
	(R) TAATACGACTCACTATAGGGCAGGGATGGTAGGCGAGAG	

dsRNA_AB	(F) TAATACGACTCACTATAGGGTTGCTGGCTTTGGATGGTG	306 pares de base
	(R)TAATACGACTCACTATAGGGATAATGTCGGGCTTCGTGAGA	

3.7 Administração do dsRNA na dieta artificial

Para os ensaios de silenciamento gênico, lagartas *H. armigera* no 2º estágio de desenvolvimento foram individualizadas em placa de Petri, contendo 5 mm³ de dieta artificial, e utilizadas para cada condição descrita a seguir. Os volumes de 2,5µl dos dsRNAs (dsRNA A, dsRNA B e dsRNA AB), contendo as doses de 0,1; 0,5; 1,0 e 10,0µg foram aplicados na dieta artificial com auxílio de pipeta automática. Como grupo controle, foi aplicado 2,5µl de água na dieta artificial. Para cada ensaio de silenciamento foram utilizados grupos de 10 insetos com uma construção de dsRNA específico nas quatro diferentes doses. No grupo controle também foram utilizados 10 insetos. Em seguida os grupos foram monitorados por 30 dias, a mortalidade contabilizada e os fenótipos dos insetos silenciados e controle fotografados.

3.8 Administração do dsRNA por via tópica

Para os ensaios de silenciamento gênico por administração tópica, lagartas *H. armigera* no 2º estágio de desenvolvimento foram individualizadas em placa de Petri, contendo de dieta artificial, e utilizadas para cada condição descrita a seguir. Os volumes de 2,5µl dos dsRNAs (dsRNA A, dsRNA B e dsRNA AB), contendo as doses de 0,1; 0,5; 1,0 e 10,0µg foram aplicados na região dorsal dos insetos com auxílio de pipeta automática. Como grupo controle, foi aplicado 2,5µl de água na mesma região. Para cada ensaio de silenciamento foram utilizados grupos de 10 insetos com uma construção de dsRNA específico nas quatro diferentes doses. No grupo controle também foram utilizados 10 insetos. Em seguida os grupos foram monitorados por 30 dias, a mortalidade contabilizada e os fenótipos dos insetos monitorados.

4. RESULTADOS

4.1 Estudo *in silico* dos genes de *CHS*

O primeiro passo do trabalho foi a busca das sequências de aminoácidos e nucleotídeos correspondentes aos genes de *CHSA* e *B* de *H. armigera* como descrito em Material e Métodos, para então, selecionar as regiões gênicas alvo do silenciamento por RNAi.

Para busca das proteínas CHS no banco de dados NCBI, foi utilizado como estratégia de busca o operador booleano “AND” e as palavras-chaves: “chitin synthase” e “helicoverpa armigera”. Na busca foram recuperadas 17 sequências, dentre *CHSA* e *CHSB*, sequências parciais, totais e diferentes isoformas. As sequências proteicas correspondentes a *CHSA* (AKJ54482.1) e *CHSB* (ALL71800.1) foram identificadas como putativas CHSs de *H. armigera* com base na cobertura das sequências.

Em seguida para confirmar a identidade de *CHSA* (AKJ54482.1) e *CHSB* (ALL71800.1), estas sequências foram alinhadas as sequências de *CHSA e CHSB* dos seguintes organismos: *Tribolium castaneum* (AAQ62692.1 e EFA10719.1), *Drosophila melanogaster* (NP_524233.1 e NP_524209.3) e *Spodoptera exigua* (AAZ03545.1 e ACC85603.1) visando identificar regiões conservadas características de CHS descritas na literatura, como assinaturas da proteína. Na Figura 9 está apresentado o alinhamento das proteínas, destacando-se domínios conservados identificados como motivos 1 a 7, característicos de CHS (NAGAHASHI et al, 1995).

Ainda para confirmar a identidade das referidas proteínas, as sequências de CHSA (AKJ54482.1) e CHSB (ALL71800.1) foram submetidas ao software Compute pI/Mw (disponível em: https://web.expasy.org/compute_pi/) para determinação *in silico* da massa molecular (MM) e do ponto isoelétrico teóricos (pI) como descrito em Material e Métodos. A MM da CHSA (AKJ54482.1) foi determinada em 178 kDa enquanto a da CHSB (ALL71800.1) foi de 175kDa. Os pIs foram 6,56 e 5,92, respectivamente.

```
                        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
ALL718001    --------MATKPKTPGFTGLGDDSED------ESEYTPLYDGVDDLEQRTAQETKGWNLFRELPVKKESGSMASTAWIDTSVKILKFLAYITIFIVVLG
ACC856031    ---------MAKPKTPGFRALDEESDE------DSELTPLYDDIEDLGQRTAQEAKGWNLFREIPVKKESGSMASTAWIDFSVKILKVGAYIFVFCIVLG
AKJ544821    -----------------MATSGGKRREEGIDNSDDELTPLANEIYGGVQRTVQETKGWDVFREFPPKQDSGSMETQKCLEFTVRLFKVMAYLVVFIAVLG
AAZ035451    -----------------MATSGGKRREEGSDNSDDELTPLANDIYGGSQRTVQETKGWDVFREFPPKQDSGSMETQKCLEFTVRLLKVTAYLVVFIAVLG
NP_5242331   MSAMRHRPMAPPGQGPGAGTAGEHVDSDDNNFTDDESSPLTHDIYGGSQRTIQETKGWDVFRDPPIKIETGSTANQECLELTVKILKIFAYVITFIIVLT
AAQ626921    ----------------------MAARHRFATGSPEETEPLYSS----TQMPEKVREKWNVFDDPPREPTVGSEVKRTYIEWGVKFLKVVTIITVFFVVLG
EFA107191    ----------------------MAARHRFATGSPEETEPLYSS----TQMPEKVREKWNVFDDPPREPTVGSEVKRTYIEWGVKFLKVVTIITVFFVVLG
NP_5242093   --------------------------------MSGGDYDSGDYFMRSRKQRDKPSLWDSFQDPPSKKTSGSDADWKKLQFCLKLFKICTYLLVFAVVLA
                    110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
ALL718001    SAVISKGTLLFITSQLK-KGKQITHCNR-ALALDQQFITVHSLEERVTWLWAAFIMFSFPEVGVFLRSVRICFFKTALKPTFLHFLASIVIETLHTVGIA
ACC856031    SAVVSKGTLLFITSQLK-KGKAIIHCNR-QLELDKQFITVHSLEERVTWLWAAFIAFSVPEVGIFLRSVRICFFKTAPKPTFLQFSTAFIVDTLHTVGIA
AKJ544821    SGVVAKGTTLFMTSQLK-KDRRIAYCNR-NLGRDKQFIVSLPDEERVAWMWAILAAFAIPEIGTLIRSVRICFFKTSRRPTSTQFIVIFIAESLHTIGMG
AAZ035451    SGVVAKGSTLFMTSQLK-KDRRIAYCNR-NLGRDKQFIVSLPDEERVAWMWAILAAFAIPEIGTLIRSVRICFFKTSRRPTSTQFAVIFIAETLHTIGMG
NP_5242331   GGVIAKGTMLFMTSQVR-KDKKMEYCNK-DLGRDKSFVVRLPEEERVAWIWALLIAYALPEIGALIRSARICFFKTFKVPKTGHFLFVWLMESLSAVGMA
AAQ626921    AAVVSKGTTLFMTSQIK-KNVTRAYCNK-KIDRNLQFVVSLPEVERVQWIWLLIFAYLIPEVGTWIRAVRKCLYKLWKMPSLSEFLSLFGTETCPAIGSA
EFA107191    AAVVSKGTTLFMTSQIK-KNVTRAYCNK-KIDRNLQFVVSLPEVERVQWIWLLIFAYLIPEVGTWIRAVRKCLYKLWKMPSLSEFLSLFGTETCPAIGSA
NP_5242093   TSVFANLIYLYMAGNTGGTGPRVQVCSKYPVLRHGQVEAVASELDQIAWVWALIFAFAAPELLTFLRALRICMFKREQRPSGLEVGLVTLFELLHVVGLA
                    210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
                      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
ALL718001    MLVLIILPELDVVKGTMLMNAMCFVPGLLNALS--RDRNERRYVWKIMLDVLAISGQATAFVVWPLLKGDTILWTIPVACVFVSLGWWENFVGSSDQQWS
ACC856031    LLVLFILPELDVVKGTMLMNAMCFIPGVLNAIT--RDRADSRYMLKMVLDVLAISAQATAFVVWPLLNGNSVLWTIPVACVFISLGWWENFVGDIGKQWP
AKJ544821    LLFFLILPELDVVKGAMITNCLCIIPAILGLLS--RNSRDSKRFMKVIVDMAAIVAQVTGFIVWPLLENKPVLWLIPVSSLCISLGWWENYV-TRQSPIG
AAZ035451    LLFFLILPELDVVKGAMITNCLCIIPAVLGLLS--RNSRDSKRFIKVIVDMAAIVAQVTGFIVWPLLENKPVLWLIPVASLCISLGWWENYV-TRQSPIG
NP_5242331   LLMFVVLPQIDAIQGAMLTNCLCVVPGIFGLLS--RTSKEGKRFVKVIIDLAAVAAQVTGLVIWPLLENRRELWVIPVACVMISCGWWENYV-SPQSPLG
AAQ626921    ILIFVVLPELDVVKGAMLTNAVCFVPGVVAMFS--RKPCSINENLKMGLDIASITAQASSFVVWPLVENNPTLYLIPVSVILISVGWWENFV-SETSYLP
EFA107191    ILIFVVLPELDVVKGAMLTNAVCFVPGVVAMFS--RKPCSINENLKMGLDIASITAQASSFVVWPLVENNPTLYLIPVSVILISVGWWENFV-SETSYLP
NP_5242093   LLTFTVLPALDVTRGAILGCCVCFVPALLNLLTGTRVRWRSADSLVLGLSILALVAQGSVFLVWPSLSDSMEVQLLAIPLLLISFRWWENFANTHEAIAY
                    310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
                      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
ALL718001    VLRPLQELRDGLKRTRYYTQRVVSVWKIFIFMCCILISLEIQHDDPFAFFTKLTTGFADRFYIVHEV---QA-VRDEFEGFLGYAVKGLTLE-IPASWST
ACC856031    VLEPVQELRDNLKKTRYYTQRVMSLWKIFIFLSCILISLAVQEDSPLAFFTEFSTGFGERFYKVHEV---QA-IQDEFEGFLGYNVMPLHFDKMPVEWAT
AKJ544821    IIKSLGRLKDELIFTRYYTYRFISVWKIMLFLMCILFSIWIDGDEPAMFFQLFNTGFGPHSIVVEEV---QIQLGGTVIPDLANVTLTGDPVEVAAAYKS
AAZ035451    IIKSLGRLKDELTFTRYYTYRFISVWKILVFLMCILFSIWLEGDEPAMFFQLFNAGFGPHSIVVEEV---QIQLGGTVIPDLANVTLTGDSVEVAAAYKS
NP_5242331   LVRALGRIKEEMKYTRYFCHIFLSIWKILLFFTVTLLIYWAQGEEPGNLFAMYGDAFGPHKIIVYEL---PAGLGGVLPDTLESANI--DTVDVDAAYNT
AAQ626921    FIRALGKSKKEFKTRTYFIYAFVAPVKCLAFFCTALVIFYCQEGSVDFLFDNFSAAFQDHNIEITEV---APVLPGNYAN---ASSVGSRNPIHTSSYMT
EFA107191    FIRALGKSKKEFKTRTYFIYAFVAPVKCLAFFCTALVIFYCQEGSVDFLFDNFSAAFQDHNIEITEV---APVLPGNYAN---ASSVGSRNPIHTSSYMT
NP_5242093   IIRTIRCTR-----SRYHTYLYLAPLKVLVF---AGMGFILHGHEFVEYFGRFRDAWRPHLITLVQSNGDPDALLLAQANVSITAPPRRTLFTMQSSPNS
                    410       420       430       440       450       460       470       480       490       500
                      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
ALL718001    PLWVVLIQVLAAYVCFGASKFACKILIQNFSFTFALSLVGPVTINFLIAACGMRNANPCAFYRTIPDYLFFDI--PPVYFLNEFAVREMSWVWLLWIVSQ
ACC856031    PLWVVLIQDVASFVCFMGSLTACKILIQNFSFTFALSLVGPVTINRLILLCGIRNADPCAFSHTIPDNLFFEI--PPVYFLREFVGKEVAWIWLLWLVSQ
AKJ544821    AFYVMLIQIFAAYICYIFGKFACKILIQGFSYAFPINLVIPLVVNLLIAACGIRNGDNCYFHGTVPDYLYFES--PPVFTLSDFISRQMAWIWLLWLLSQ
AAZ035451    AFYVMLIQIFAAYICYIFGKFACKILIQGFSYAFPINLVIPLVVNLLIAACGIRNGDNCYFHGTVPDYLYFES--PPVFTLSDFISRQMAWIWLLWLLSQ
NP_5242331   VVYVLLLQIFGAYLCYIFGKFACKILIQGFSYAFPVSLTVPLSVTFLIAACGIRIDDPCFFHDTIPDYLFFTS--PSNFRFNNFVTEQMAWAWILWLLSQ
AAQ626921    GIWVWLINISATYICYAFGKFSCKVMIQSVSFAFPINLSVPVLLSGLIAMCGMYYRDECSFAESIPPYLFFVP--PPLMFLQDFLSHQHAWIWLVWLLSQ
EFA107191    GIWVWLINISATYICYAFGKFSCKVMIQSVSFAFPINLSVPVLLSGLIAMCGMYYRDECSFAESIPPYLFFVP--PPLMFLQDFLSHQHAWIWLVWLLSQ
NP_5242093   VFYALAAQVGAAYLCHIFGKFACKIKIQKFSYALPLSLAGPATVCLVTFLAQLRASDPCSLHGFMPDYLSLLALGGSVEELGQRCLDYALWLWPLWWLAQ
                    510       520       530       540       550       560       570       580       590       600
                      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
ALL718001    AWVTAHTWQPRCERLAATDKLFAKPWYCSAVIDQSLLLNRTKDDDTDIALEDLKGLDADADSIV----------SGEKVSKDVKPSDSITRIYVCATMWH
ACC856031    AWVTAHNWKSRAERLAASDRLFNRPWYCSPVIDQSMLLSRTKNEEAELTLEELKDTVTEDGSEL----------SGFEVKKDVKPSDSITRIYVCATMWH
AKJ544821    TWITIHIWTPKAERLASTEKLFVMPMYNGLLIDQSMALNRKRNDQRDVKTEDLAEIEKEKGDEYYETISVHTDNTGSSPK-AIKSSDQITRIYACATMWH
AAZ035451    TWITIHIWTPKAERLASTEKLFVMPMYNGLLIDQSMALNRKRNDQRDVKTEDLAEIEKEKGDEYYETISVHTDNTGSSPK-AIKSSDQITRIYACATMWH
NP_5242331   TWIALHIWTPKCERLATTEKLFVQPMYSSLLIDQSMALNRRRDDQADVKTEDLSEIEKEKGDEYYETISVHTDRSSAPNKPSIKSSDNITRIYSCATMWH
AAQ626921    AWISVHIWSPNCDKLSSTEQLFIRPMYDAFLIDQSLALNRRRDENPRNYRSDEGPQITELEPE------------------TIESQDAITRIYACGTMWH
EFA107191    AWISVHIWSPNCDKLSSTEQLFIRPMYDAFLIDQSLALNRRRDENPRNYRSDEGPQITELEPE------------------TIESQDAITRIYACGTMWH
NP_5242093   VWTCLHIWQPHNDRNAPTEKLFVCPWYCGLLVDQCSMMNRRIVDWSEEYLAIKSDLTAPRDPVVALA-------ADINASRDIQEEDKVPQLIVCATMWH
```

```
                    610       620       630       640       650       660       670       680       690       700
                      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
ALL718001     ETKEEMMEFLKSIFRLDEDQSARRVAQKYL--GIVDPDYYELEVHIFMDDAFEVSD---HSSEDSQVNRFVTCLVDTIDEAASEVHLTNVRLRPPKKYPT
ACC856031     ETKEEMMDFLKFILRFDEDQSARRVAQKYL--GIVDPDYYELEVHIFMDDAFEVSD---HSADDSKVNPFVTCLVETVDEAASEVHLTNVRLRPPKKYPT
AKJ544821     ETKDEMMEFLKSILRLDEDQCARRVAQKYL--RVVDPDYYEFETHIFLDDAFEISD---HSDDDSQVNRFVKLLVDTIDEAASEVHQTNIRIRPPKRLPA
AAZ035451     ETKDEMMEFLKSILRLDEDQCARRVAQKYL--RVVDPDYYEFETHIFLDDAFEISD---HSDDDSQVNRFVKLLVDTIDEAASEVHQTNIRIRPPKKYPA
NP_5242331    ETKDEMIEFLKSIMRMDEDQCARRVAQKYL--RVLDPDYYEFETHIFFDDAFEISD---HSDDDIQCNRFVKLLIATMDEAASEIHQTTIRLRPPKKYPT
AAQ626921     ETPEEMMEFLKSVFRLDQDQCSHRIVREHL--GLKHDNYYELETHIFFDDAFIRTS---EDDNDPHVNEYVESLASIIDEAATKVHGTTVRVRPPKVYPT
EFA107191     ETPEEMMEFLKSVFRLDQDQCSHRIVREHL--GLKHDNYYELETHIFFDDAFIRTS---EDDNDPHVNEYVESLASIIDEAATKVHGTTVRVRPPKVYPT
NP_5242093    ETEDEMMEFLKSIVRLDEDQCARRMARTHLNGGKADDEYYELETNIFFDDAFVSDPRQCQNKRNPPINEYVKTLTRTIDKAAFEVYGVNIRIKPPLKIET

                    710       720       730       740       750       760       770       780       790       800
                                Motivo 1                                  Motivo 2  Motivo 3
ALL718001     PYGGRLVWTLPGKNKMICHLKDKSKIRHRKRWSQVMYMYYFLGHRLM-DLPISVDRKEVIAENTYLLALDGDIDFKPIAVTLLIDLMKKDKNLGAACGRI
ACC856031     PYGGRLVWTLPGKNKMICHLKDKSKIRHRKRWSQVMYMYYLLGHRLM-DLPISVDRKEVIAENTYLLALDGDIDFKPTAVTLLIDLMKKDKNLGAACGRI
AKJ544821     PYGGRLTWVLPGKTKMICHLKDKAKIRHRKRWSQVMYMYYLLGHRLM-ELPISVDRKEVMAENTYLLTLDGDIDFQPHAVRLLIDLMKKNKNLGAACGRI
AAZ035451     PYGGRLTWVLPGKTKMICHLKDKAKIRHRKRWSQVMYMYYLLGHRLM-ELPISVDRKEVMAENTYLLTLDGDIDFQPHAVRLLIDLMKKNKNLGAACGRI
NP_5242331    PYGGRLVWTLPGKTKFITHLKDKDRIRHRKRWSQVMYMYYLLGHRLM-ELPISVDRKDAIAENTYLLTLDGDIDFKPNAVTLLVDLMKKNKNLGAACGRI
AAQ626921     PYGGRLVWTLPGKTKMIAHLKDKKKIRAKKRWSQCMYMYFLLGFRLQANDELSAHSKEIRGENTYILALDGDIDFQPEALHLLVDYMKKNKTLGAACGRI
EFA107191     PYGGRLVWTLPGKTKMIAHLKDKKKIRAKKRWSQCMYMYFLLGFRLQANDELSAHSKEIRGENTYILALDGDIDFQPEALHLLVDYMKKNKTLGAACGRI
NP_5242093    PYGGRLVWTLPGRTKMVAHLKNKDKIRHKKRWSQVMYMYYLLGYRIMETKELSPRRKAVIAENTFILALDGDIDFQPRAVRLLIDRMKAVDELGAACGRI

                    810       820       830       840       850       860       870       880       890       900
                                                Motivo 4                                Motivo 5
ALL718001     HPVGSGFMAWYQMFEYAIGHWLQKATEHMIGCVLCSPGCFSLFRGKALMDDNVMKKYTLTSHEARHYVQYDQGEDRWLCTLLLQRGYRVEYSAASDAYTH
ACC856031     HPVGSGFMAWYQMFEYAIGHWLQKATEHMIGCVLCSPGCFSLFRGEALMDDNVMKKYTLTSHEARHYVQYDQGEDRWLCTLLLRRGYRVEYSAASDAYTH
AKJ544821     HPVGSGPMVWYQMFEYAIGHWLQKATEHMIGCVLCSPGCFSLFRGKALMDDNVMKKYTLRSDEARHYVQYDQGEDRWLCTLLLQRGYRVEYSAASDAYTH
AAZ035451     HPVGSGPMVWYQMFEYAIGHWLQKATEHMIGCVLCSPGCFSLFRGKALMDDNVMKKYTLRSDEARHYVQYDQGEDRWLCTLLLQRGYRVEYSAASDAYTH
NP_5242331    HPVGSGPMVWYQLFEYAIGHWLQKATEHMIGCVLCSPGCFSLFRGKALMDDNVMKKYTTRSDEARHYVQYDQGEDRWLCTLLLQRGYRVEYSAASDAYTH
AAQ626921     HPIGSGGMVWYQMFEYAVGHWMQKATEHVIGCVLCSPGCFSLFRGKALMDKSVMKKYTTRSTQAKHYVQYDQGEDRWLCTLLLQRGYRVEYSAASDAFTH
EFA107191     HPIGSGGMVWYQMFEYAVGHWMQKATEHVIGCVLCSPGCFSLFRGKALMDKSVMKKYTTRSTQAKHYVQYDQGEDRWLCTLLLQRGYRVEYSAASDAFTH
NP_5242093    HPVGRGPMVWYQRFEYAIGHWLQKATEHVIGCVLCSPGCFSLFRASALMENSVMKRYTMISSEAMKMVQYDQGEDRWLCTLLLKAGSRVEYCAASDAYTH

                    910       920       930       940       950       960       970       980       990      1000
                  Motivo 6
ALL718001     CPEQFDEFFNQRRRWVPSTMANIFDLLADAKRTISINDNISTLYIMYQSMLMFGTILGPGTIFLMMVGAMNAITQMSMSNALILNLVPILIFIVVCMTCK
ACC856031     CPEHFDEFFNQRRRWVPSTLANIFDLLASAKMTVKANDNISTLYIVYQFMLIVGTVLGPGTIFLMMVGAMNAIIQISNLYAMMLNLVPLIIFLIVCMTCQ
AKJ544821     CPEGFNEFYNQRRRWVPSTIANIMDLLADCKHTIKINDNISSPYIAYQMMLMGGTILGPGTIFLMLVGAFVAAFRIDNWTSFEYNLYPILIFMFVCFTMK
AAZ035451     CPEGFNEFYNQRRRWVPSTIANIMDLLADCKHTIKINDNISSPYIAYQMMLMGGTILGPGTIFLMLVGAFVAAFRIDNWTSFEYNLYPILIFMFVCFTMK
NP_5242331    CPEGFNEFYNQRRRWVPSTIANIMDLLADAKRTIKINDNISLLYIFYQMMLMGGTILGPGTIFLMLVGAFVAAFRIDNWTSFHYNIVPILAFMFICFTCK
AAQ626921     CPEGFNEFYNQRRRWMPSTMANILDLLMDYEHTVKINENISMLYIGYQIILMIGTVIGPGTIFLMLVGAFVAAFGLDQWSSFYWNLLPIAVFILVCATCS
EFA107191     CPEGFNEFYNQRRRWMPSTMANILDLLMDYEHTVKINENISMLYIGYQIILMIGTVIGPGTIFLMLVGAFVAAFGLDQWSSFYWNLLPIAVFILVCATCS
NP_5242093    APESFNEFYNQRRRWVPSTIANIFDILADADTVVKKNNSISTMYVWYQGMLMIGTVLGPGTIFLMMVGALVAVFSIDIWTAFLWNFFPILLFILACVYLK

                   1010      1020      1030      1040      1050      1060      1070      1080      1090      1100
                                                                                                   Motivo 7
ALL718001     SETQLFLASLITCAYAMVMMLVIVGIVLQIVEDGWLAPSSLFTAVIFGTFFVTAALHPQEIICLLYLTVYYVTIPSMYMLLIIYSLCNLNNVSWGTREVV
ACC856031     SKTQLFLANLITCAYAMVMMIVLVGIVLQIVEDGWLAPSSMFTALIFGTFFITAVLHPQEIKCLLYLAVYYVTIPSMYMLLIIYSICNLNNVSWGTRETV
AKJ544821     SEIQLLVAQILSTAYAMIMMAVIVGTALQLGEDGIGSPSAIFLISLSSSFFIAACLHPQEFWCIVPGIIYLLSIPSMYLLLILYSIINLNVVSWGTREVQ
AAZ035451     SEIQLLVAQILSTAYAMIMMAFIVGTALQLGEDGIGSPSAIFLISLSSSFFIAACLHPQEFWCIVPGIIYLLSIPSMYLLLILYSIINLNVVSWGTREVA
NP_5242331    SNIQLFVAQVLSTAYALIMMAVIVGTALQLGEDGIGSPSAIFLISMVGSFFIAACLHPQEFWCITCGLIYLLSIPSMYLLLILYSIINLNVVSWGTREVV
AAQ626921     SDIQLFFAGLISAIYGLIMMAVFVGVMLQISQDGPLAPSSLFFFCMAAEFIIAALLHPQEFNCLKYGVIYYVTVPSMYLLLVIYSVFNMNNVSWGTREVT
EFA107191     SDIQLFFAGLISAIYGLIMMAVFVGVMLQISQDGPLAPSSLFFFCMAAEFIIAALLHPQEFNCLKYGVIYYVTVPSMYLLLVIYSVFNMNNVSWGTREVT
NP_5242093    QKFQLLIAFVISSVYCLVMMAVLIGIIVQMLEDGPLAPASLFFLLVAVQITIAGFMHPQEFWALLCGVIYYITIPSMYMLLMIFSVFNMNDVSWGTREAP

                   1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
                      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
ALL718001     QKKTAKEMEQERKEAEEAKKKMDEKSIQKWF----GKSDETSGSLEMSVAGLFKCMCCTNPKDHKEDLHLLQIATAIEKIDKRLEALGAPPE-----ETE
ACC856031     QKKTAKEMEMEKKEAEEAKKKMENQSLRKLF----GKGEETSGSLEFSVAGLFRCMCCTNPVDHKDDLHMMQISHALEKINKRLDALDVPPE-----QT-
AKJ544821     VKKTKKEIEAEKKEAELAKKSAKQKSLLGFLQ-GVNSN-EEEGSIEVSFAGLFKCLLCTHPKGNEEKVQLLHIASTLEKLEKKLDSVERAVDPHGMSRGR
AAZ035451     VKKTKKEIEAEKKEAELAKKSAKQKSLLGFLQ-GVNSN-EEEGSIEFSFAGLFKCLLCTHPKGNEEKVQLLHIASTLEKLEKKLETVERAVDPHGISRGR
NP_5242331    AKKTKKELEAEKKAAEEAKKRVKQKSMLSFLQSGIGDNGDEEGSVEFSLAGLFRCIFCTHGKTSDEKQQLTSIAESLDTIKHRMDTIESAVDPHGHHASR
AAQ626921     VVPKPDPNAVQKIEEKKPEKKDKVLTFLG------ANAQDDEGGLEFSVNKLFKCMICTYKADNKENEQLRKIQESLRDLNRKIESLEKMQYP-------
EFA107191     VVPKPDPNAVQKIEEKKPEKKDKVLTFLG------ANAQDDEGGLEFSVNKLFKCMICTYKADNKENEQLRKIQESLRDLNRKIESLEKMQYP-------
NP_5242093    VLK-----------------------------------DDG-----------------------------KDAVDEANNYL----------------
```

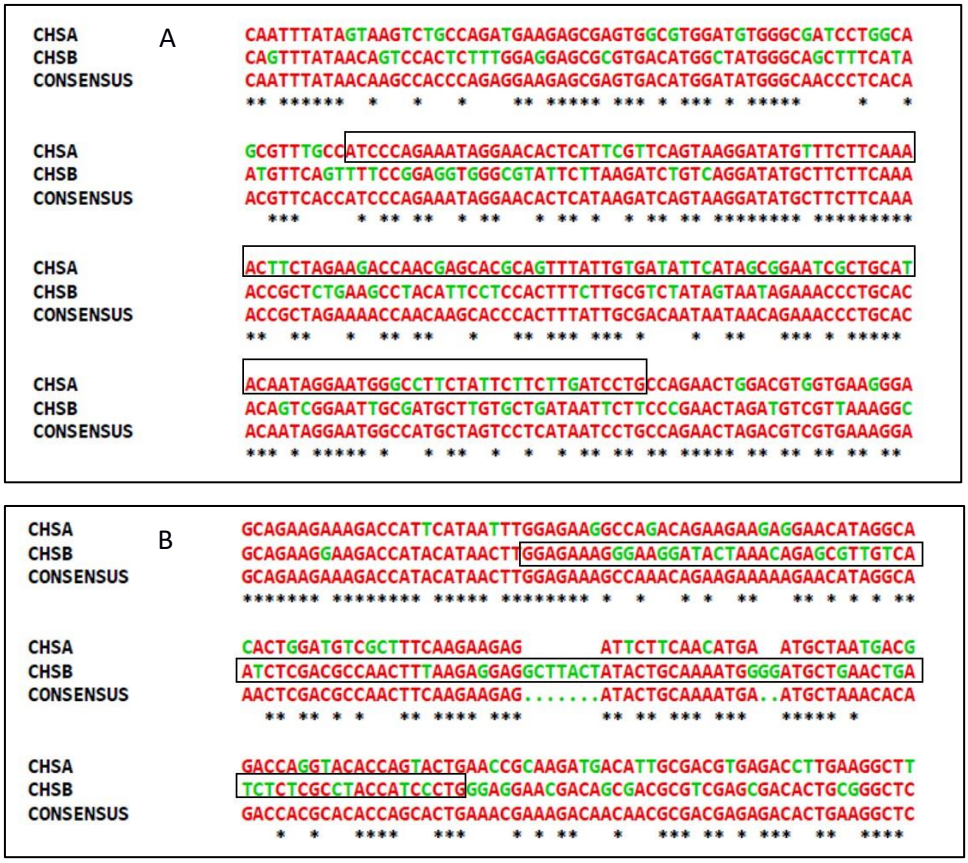
```
                    1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280      1290      1300
                       |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
ALL718001     PLNRRRSSAVLRRQSLDPLARVPEYEESDVS-----SDVPRDERDDLINPYWIEDVNLQKGEVDFLTTAETEFWKDLIDVYLRPIDENKQELERIKTDLK
ACC856031     ------LTQTLPHTNIDTVS-VREYEDSEIS-----TEIPREERDDLINPYWIEDVELQKGEVDFLTTAETNFWKDVIDEYLLPIEEDKRELERIKTDLK
AKJ544821     KLSVGPRGSTTGDHGLDALDERPEEENDSDSETDTLSTVPREKRDDLINPYWIEDPELKKGEVDFLSPAELSFWKDLIDKYLYPIDANKEEQARISKDLK
AAZ035451     KLSVGPRGSTTGDHGLDALAEGPEEDNDSDSETDTLSTVPREKRDDLINPYWIEDPELKKGEVDFLSPAELSFWKDLIDKYLYPIDANKEEQARISKDLK
NP_5242331    HGRRRTTSSGSKDHHLLTSVAEKSGDESDESDSDT-SAEPKQERDFLTNPYWIEDPDVRKGEVDFLSSTEIQFWKDLIDQYLYPIDNDPVEQARIAKDLK
AAQ626921     ---DLRSPAVSNVTTFMEGSKATVKNNVEDNYMEAPQDNVSQPSDEVMENSWFYDGPLIRGEVHYLNRNEETFWNELIEQYLHPIEDDKK---KVSAELK
EFA107191     ---DLRSPAVSNVTTFMEGSKATVKNNVEDNYMEAPQDNVSQPSDEVMENSWFYDGPLIRGEVHYLNRNEETFWNELIEQYLHPIEDDKK---KVSAELK
NP_5242093    ------------------------------------------------PGWLNDPLLIDSELGEVSLMEQRFWKDLIKQYLKPLELSREQKQAMADGLK

                    1310      1320      1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
                       |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
ALL718001     NLRDKSVFAFVMLNSLFVLMIFLLQLNQDQLHFKWPFGQSASIEYDDQMNVFHITQDYLTLEPIGSLFIIFFGSIIIIQFTAMLFHRLGTLTHLLSNVQL
ACC856031     NLRDKMVFAFVMLNSLFVLVIFLLQLSQDQLHFKWPFGQKSSMEYDNDSNMFTITQDYLTLEPIGFVFLIFFGSIILIQFTAMLFHRLDTLAHLLSTTKL
AKJ544821     ELRDSSVFSFFMVNALFVLIVFLLQLNKDNLHFKWPFGVKTNITYDEVTQEVLISKEYLQLEPIGLVFVFFFALILVIQFSAMLFHRFGTLSHILASTEL
AAZ035451     ELRDSSVFSFFMVNALFVLIVFLLQLNKDNLHIKWPFGVKTNITYDEVTQEVLISKEYLQLEPIGLVFVFFFALILVIQFSAMLFHRFGTLSHILASTEL
NP_5242331    ELRDSSVFAFFMINALFVLIVFLLQLNKDNIHVKWPFGVRTNITYDESTQEVHISKEYLQLEPIGLVFVFFFALILIIQFTAMLFHRFGTISHILASTEL
AAQ626921     DLRDKMVFTFLMLNSLYVIVIFLLTLKKDLLHLDWPFDPKVNFTYFEDKNEIGVYITYLQLEPIGFVFLIFFALLMVIQFFAMMIHRFGTFSQIITKTQL
EFA107191     DLRDKMVFTFLMLNSLYVIVIFLLTLKKDLLHLDWPFDPKVNFTYFEDKNEIGVYITYLQLEPIGFVFLIFFALLMVIQFFAMMIHRFGTFSQIITKTQL
NP_5242093    ELRNMIAFAFVMVNAIFVLIVFLLQLKKEFLHLEWPIDPTDFVSFDRDNLMVGIYRQYKELDPIGLCFVIFFGLILIIQFLAMFFHRFATLCQLLATTQV

                    1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500
                       |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
ALL718001     NW-YFTKKPDDMSDNALIESRALEIAKDLQRLNTDDLEKRDNN----QHVSRRKTIHNLEK--GKDTKQSVVNLDANFKRRLTILQNGDAELISRLPSLG
ACC856031     DW-YFNKKPDDLSDDALIDSLALTIAKDLQRLNTDDLDKRDNN----DHVTRRKTIHNLEK--GKESKPAIINLDANFKRRLTILQNGDSELISRLPSLG
AKJ544821     NW-FCSKKSDDLSQDALLDKNAIAIVKDLQKLNGLDDDYDNDSGSGPHNVGRRKTIHNLEK--ARQKKRNIGTLDVAFKKRFFNM-NAN--DGPGTPVLN
AAZ035451     NW-FCSKKSDDLSQDALLDKNAIAIVKDLQKLNGLDDDYDNDSGSGPHNVGRRKTIHNLEK--ARQKKRNIGTLDVAFKKRFFNM-NAN--DGPGTPVLN
NP_5242331    N--FCKKKSEDLTQDQLIDKHAVEIVKNLQRLQGIDGDYDNDSGSGPDRIARRKTIQNLEK--ARQPRRQIGTLDVAFKKRFLKL-TADAENNPATPILT
AAQ626921     DFDLCSKPIDEMTVDELRSRDPIKIVADLQKLKGINNEYEDQT---EVPVEMRKTVSNLAQTSGGGENKPIFYLDEAFQRRVTQI-GSTSSNNPSISAFR
EFA107191     DFDLCSKPIDEMTVDELRSRDPIKIVADLQKLKGINNEYEDQT---EVPVEMRKTVSNLAQTSGGGENKPIFYLDEAFQRRVTQI-GSTSSNNPSISAFR
NP_5242093    DWFRTGGQFTDEDAATELKGSAVSIARKLQRPKRLFDDDEDG-----DPHYDEVLMDSLE----GEHRESMVRRQTIFRLHETRDKQHSDYSNLVFNFER

                    1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
                       |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
ALL718001     GTTATRRATLRALKTRRDSV-VAERRRSQMQARDSTTDF------MFNSPGA--LEDLG--SRASV----------------------GAYVNRGYEPALD
ACC856031     GNWATRRATVRALTTRRESV-MAERRKSQMQSRPSEGTF------MYNPPGMIQLDDMG--GRPSTA--------------------GVYVNRGYEPALD
AKJ544821     RKMTLRRETLKALETRRNSV-MAERRKSQMQTLGANNEYGVT-GMLNNNHGVVPRHRT---STANISVKDVF-----------GEPNGGQVNRGYETTLG
AAZ035451     RKMTLRRETLKALETRRNSV-MAERRKSQMQTLGANNEYGVT-GMLNNNLGVGPRHRT---SNANISVKDVF-----------GEPNGGQVNRGYETTIG
NP_5242331    RRLTMRAETIRALEVRKNSV-MAERRKSAMQTLGAKNEYGITTGAPINNNGALPNQRSGRVSNAGISIKDVFNVNGGGAEQIYGSNGGGTINQGYEHVID
AAQ626921     KKSLAYVQQRMSIAPNRVSQ-ARPSVQLRYPNGKANENF------VFDENGSDVEA------------------------------------------
EFA107191     KKSLAYVQQRMSIAPNRVSQ-ARPSVQLRYPNGKANENF------VFDENGSDVEA------------------------------------------
NP_5242093    RFFGDDELNLKNLALNRKSVKLLQERRSAAKVNAAATPEGTPTPKAGKRPPVVPMAKKVSFTASNRN------------------NMALYDNGGYEHTEF

                    1610      1620      1630      1640
                       |         |         |         |
ALL718001     SEVEDTPP--PPRRSTVRFQDHYA----------------
ACC856031     SDIEDTPV--PPRRSTVRFQDHFA----------------
AKJ544821     DEDDNNSMRLQPRQNQVSFQGRF-----------------
AAZ035451     DEDDTNSMRLQPRQNQVSFQGRF-----------------
NP_5242331    EDGDGNSLRLTTRNPHPHPHHQVSWGQNTNGGGGNGTGRL
AAQ626921     ----------------------------------------
EFA107191     ----------------------------------------
NP_5242093    ----------------------------------------
```

Figura 9. Alinhamento das sequências completas de aminoácidos das CHSA e CHSB de *Tribolium castaneum* (AAQ62692.1 e EFA10719.1), *Drosophila melanogaster* (NP_524233.1 e NP_524209.3) e *Spodoptera exigua* (AAZ03545.1 e ACC85603.1) com as sequências CHSA (AKJ54482.1) e CHSB (ALL71800.1) de *H. armigera*. Destacam-se nos retângulos pretos os domínios conservados de CHS.

Em seguida as sequências de proteínas CHSA (AKJ54482.1) e CHSB (ALL71800.1) foram utilizadas para recuperar as sequências de nucleotídeos dos genes *CHSA* (KP939100.1) e *CHSB* (KT004448.1) no NCBI. Estas sequências foram alinhadas e assim foi possível selecionar as regiões alvo de silenciamento por RNAi.

A estratégia utilizada foi a escolha da *CHSB*, presente no intestino, como alvo principal do silenciamento, para isso foi escolhido como alvo uma região do domínio catalítico (de 2175 a 2481 nt) que apresenta 84% de identidade com a mesma região da *CHSA*. Um segundo alvo foi a região correspondente ao carboxi-terminal da *CHSB* (de 4199 a 4314 nt) que apresenta 61% de identidade com a *CHSA*. Um terceiro alvo de silenciamento foi selecionado da região correspondente ao amino-terminal da *CHSA* (de 417 a 561 nt) que apresenta 54% de identidade com a *CHSB*. A ideia era a escolha de duas regiões mais distintas e uma região mais homóloga entre as sequências de *CHSA* e *CHSB.*

A Figura 10 apresenta o alinhamento de *CHSA* e *CHSB*, destacando as regiões selecionadas como alvo de silenciamento por RNAi.



```
CHSA        C   GCTGCCGATATCTGTGGACCGTAAAGAAGTAATGGCTGAGAACACCTACCTGCTGACCCT
CHSB            CTTGCCGATCTCTGTGGATCGCAAGGAGGTTATCGCTGAGAACACTTATTTGCTGGCTTT
CONSENSUS       CCTGCCGATATCTGTGGACCGCAAAGAAGTAATCGCTGAGAACACCTACCTGCTGACCCT
                  ******* ******** ** ** ** ** ** *********** **  ***** *  *

CHSA            GGACGGAGACATCGATTTCCAACCTCACGCTGTACGACTGCTTATCGATTTGATGAAGAA
CHSB            GGATGGTGACATTGACTTCAAGCCTATAGCCGTCACCTTGCTTATTGATCTTATGAAGAA
CONSENSUS       GGACGGAGACATCGACTTCAAACCTAAAGCCGTAACACTGCTTATCGATCTGATGAAGAA
                *** ** ***** ** *** * ***   ** **     ******* *** * ********

CHSA            GAACAAGAATCTGGGAGCTGCGTGCGGCCGTATTCATCCTGTCGGATCAGGTCCCATGGT
CHSB            GGACAAGAACTTGGGAGCAGCGTGTGGACGTATCCATCCTGTGGGCTCTGGCTTCATGGC
CONSENSUS       GAACAAGAACCTGGGAGCAGCGTGCGGACGTATCCATCCTGTCGGATCAGGCCCCATGGC
                * *******  ******* ***** ** ***** ******** ** ** **   *****

CHSA            GTGGTATCAAATGTTCGAGTACGCTATTGGTCATTGGCTGCAAAAGGCGACGGAACACAT
CHSB            TTGGTACCAAATGTTCGAGTACGCTATTGGTCATTGGCTGCAAAAGGCGACAGAACACAT
CONSENSUS       GTGGTACCAAATGTTCGAGTACGCTATTGGTCATTGGCTGCAAAAGGCGACAGAACACAT
                 ***** ********************************************** ********

CHSA            GATCGGCTGCGTACTCTGTAGTCCTGGATGCTTCTCTCTGTTCAGAGGAAAGGCTTTGAT
CHSB            GATCGGCTGCGTACTCTGTAGTCCTGGATGCTTCTCTCTGTTCAGAGGAAAGGCTTTGAT
CONSENSUS       GATCGGCTGCGTACTCTGTAGTCCTGGATGCTTCTCTCTGTTCAGAGGAAAGGCTTTGAT
                ************************************************************

CHSA            GGACGACAACGTCATGAAGAAATACACTTTACGGTCTGATGAAGCTCGGCATTACGTGCA
CHSB            GGACGACAACGTCATGAAGAAATACACACTGACTTCTCACGAAGCCCGACATTATGTACA
CONSENSUS       GGACGACAACGTCATGAAGAAATACACACTAACGTCTCACGAAGCCCGACATTACGTACA
                ***************************  *    *** * ***** ** ***** ** **
```

Figura 10. Alinhamento das sequências de nucleotídeos de *CHSA* e *CHSB* de *H. armigera,* destacadas em retângulos pretos as regiões alvo de silenciamento. (A) Região no gene *CHSA* (de 417 a 561 nt); (B) Região no gene *CHSB* (de 4199 a 4314 nt); (C) Região no gene *CHSB* que possui alta homologia com *CHSA* (de 2175 a 2481 nt).

4.2 Perfil de expressão dos genes *CHSA* e *CHSB* em *H. armigera*

Com o objetivo de determinar os níveis de expressão de *CHSA* e *CHSB* em diferentes etapas do desenvolvimento de *H. armigera*, o RNA total dos insetos nas fases de ovo, larva (L1-L6) e pupa foram extraídos e os respectivos cDNAs confeccionados. Em seguida os níveis de expressão dos genes de *CHSA* e *CHSB* foram determinados por qPCR, conforme descrito em Material e Métodos.

Na Figura 11 é apresentado os níveis de expressão de *CHSA*, onde é possível observar que os níveis de transcrito são mais altos nos estágios de L1-L4 e diminuem significativamente nos estágios de larvas L5 e L6 e pupa, tendo o estágio de ovo como referência. Na Figura 12 é apresentado os níveis de expressão de *CHSB*, onde é possível observar um pico de expressão do gene nos estágios iniciais de L1 a L3, seguido de uma redução nos níveis de expressão nos estágios avançados de larva e pupa, tendo o estágio de ovo como referência.

De acordo com o perfil de expressão dos *CHSA* e *CHSB*, foi possível determinar que os estágios iniciais de larva foram os momentos que ambos os genes estão expressos de forma mais abundante em *H. armigera*, dessa forma o estágio de L2 foi selecionado para os bioensaios com dsRNA.

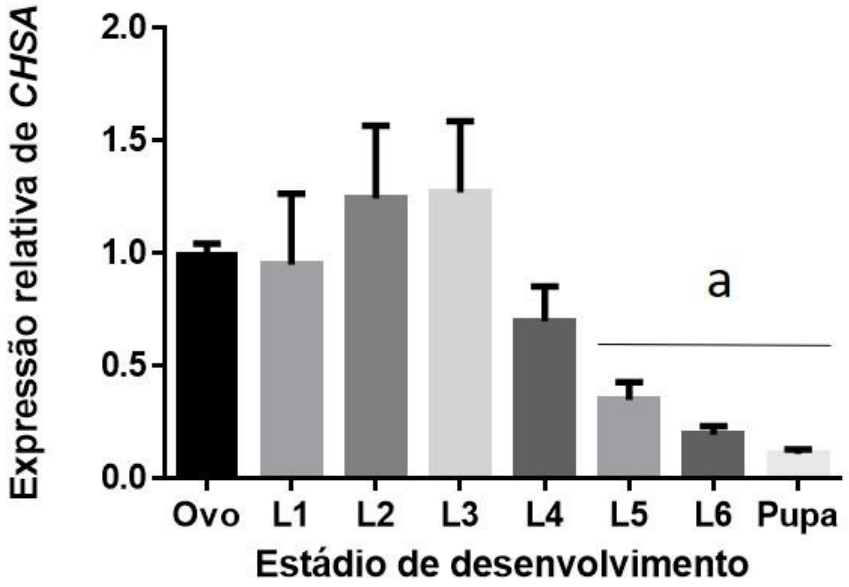


Figura 10. Perfil de expressão de *CHSA* no ciclo de vida de *H. armigera.* O gene *alfa tubulina* foi utilizado como normalizador e o nível de expressão do estágio de ovo foi considerado basal (ou 1). A barra de erro representa o desvio padrão de 3 experimentos independentes e a análise estatística utilizada foi ANOVA seguida de Tukey. As letras representam significância estatística para P<0,05.

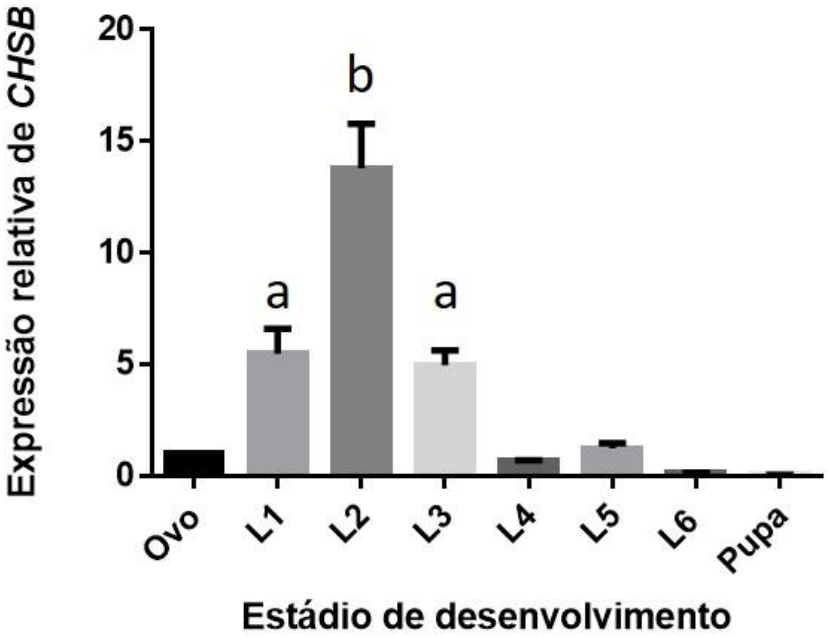


Figura 11. Perfil de expressão de *CHSB* no ciclo de vida de *H. armigera.* O gene *alfa tubulina* foi utilizado como normalizador e o nível de expressão do estágio de ovo foi considerado basal (ou 1). A barra de erro representa o desvio padrão de 3 experimentos independentes e a análise estatística utilizada foi ANOVA seguida de Tukey. As letras representam significância estatística para P<0,05.

4.3 Integridade das moléculas de dsRNA a serem administradas nos insetos.

O passo seguinte foi realizar a síntese das moléculas de dsRNA, onde uma construção, dsRNA A, que tem como alvo a CHSA e duas construções, dsRNA B e dsRNA AB que têm como alvo de silenciamento o gene *CHSB*.

Logo após a síntese, os produtos de dsRNA foram analisados em gel de agarose para verificar a integridade das moléculas. Na Figura 13 é possível observar que os tamanhos das construções dsRNA A, dsRNA B e dsRNA AB são 144, 115 e 306 pb, respectivamente, como esperado.

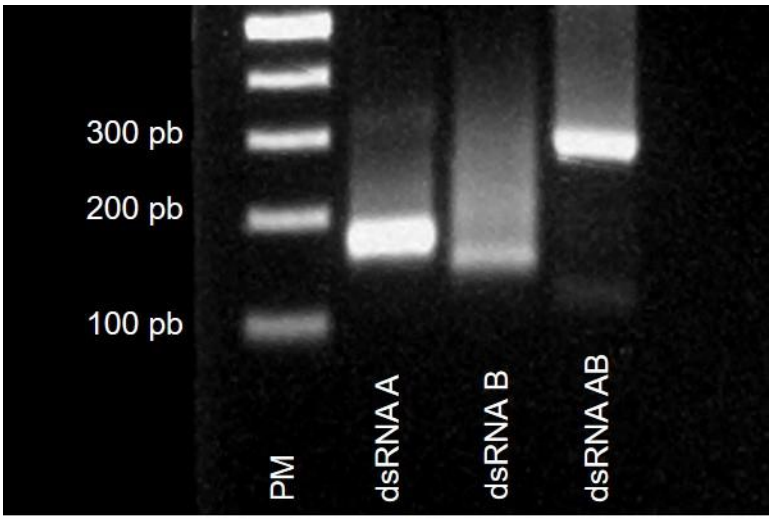


Figura 13. Visualização dos dsRNAs em gel de agarose 1,5%. Da esquerda para a direita: Padrão molecular, dsRNA A (144 pb), dsRNA B 115 pb) e dsRNA AB (306 pb).

4.4 Bioensaios

4.4.1 Administração do dsRNA na dieta do inseto

As construções de dsRNA foram testadas nas com as doses de 0,1; 0,5; 1,0 e 10,0 µg por 5 mm^3 de dieta artificial em grupos de 10 insetos de 2º estádio, como descrito em Material e Métodos. Na figura 13 são apresentadas as curvas de sobrevivência dos ensaios feitos com a administração dos dsRNAs na dieta artificial. Podemos observar que as taxas de mortalidade variaram de acordo com as diferentes doses de dsRNAs administradas na dieta, foi observada uma mortalidade na ordem de 30 a 60% para a construção dsRNA A, de 40 a 80% para a construção dsRNA B e de 40 a 50% para a construção dsRNA AB no período de 30 dias, com as diferentes doses. As análises estatísticas apontam diferenças significativas entre os grupos de insetos tratado e controle para as construções dsRNA A e dsRNA B utilizando as doses de 1,0 e 10 µg por 5 mm^3 de dieta artificial. A construção dsRNA AB não houve diferença significativa em nenhuma das doses administradas na dieta quando comparada ao controle.

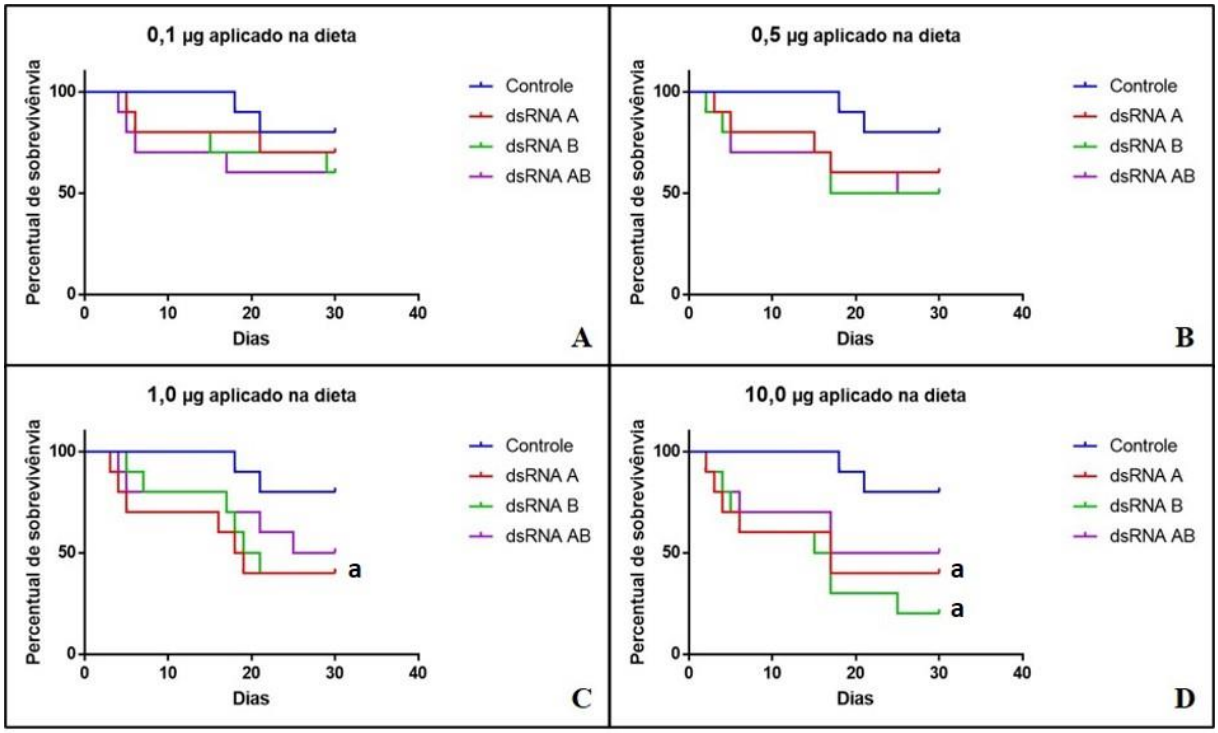


Figura 13. Curva de sobrevivência de insetos alimentados com diferentes doses de dsRNA adicionadas em 5mm³ da dieta artificial, 10 insetos por grupo, no período de 30 dias. As curvas de sobrevivência em azul referem-se ao controle água, em vermelho dsRNA A, em verde dsRNA B e em roxo dsRNA AB. As doses em (A) 0,1 µg; (B) 0,5 µg; (C) 1,0 µg; (D) 10,0µg/ 5mm³ da dieta. A análise estatística da média de três experimentos independentes, entre os grupos tratados e controles foram feitas utilizando os testes Log-Rank (Mantel-Cox) e Wilcoxon (Gehan), a letra no gráfico representa diferença significativa em relação ao controle (P<0,05).

4.4.2 Administração do dsRNA por aplicação tópica

Como administração na dieta impossibilita o conhecimento sobre a real da massa de dsRNA ingerida pelo inseto, uma vez que o inseto pode se alimentar pouco ou não se alimentar, optamos também pela administração do dsRNA por via tópica com a dose de 0,1; 0,5; 1,0 e 10,0 µg por inseto.

As três construções de dsRNA, separadamente, foram aplicadas na região dorsal das larvas de 2º estádio do desenvolvimento e acompanhado o desenvolvimento por 30 dias como descrito em Material e Métodos.

Na figura 14 são apresentadas as curvas de sobrevivência dos insetos tratados com a aplicação tópica dos diferentes dsRNAs. Podemos observar que as taxas de mortalidade foram na ordem de 60 a 80% para as construções dsRNA A e dsRNA B e de 60 a 90% para a construção dsRNA AB variando de acordo com as diferentes doses de dsRNA administradas. As análises estatísticas apontam diferença significativa entre o grupo tratado e o controle para as 3 construções nas doses de 1,0 e 10,0 µg por inseto.

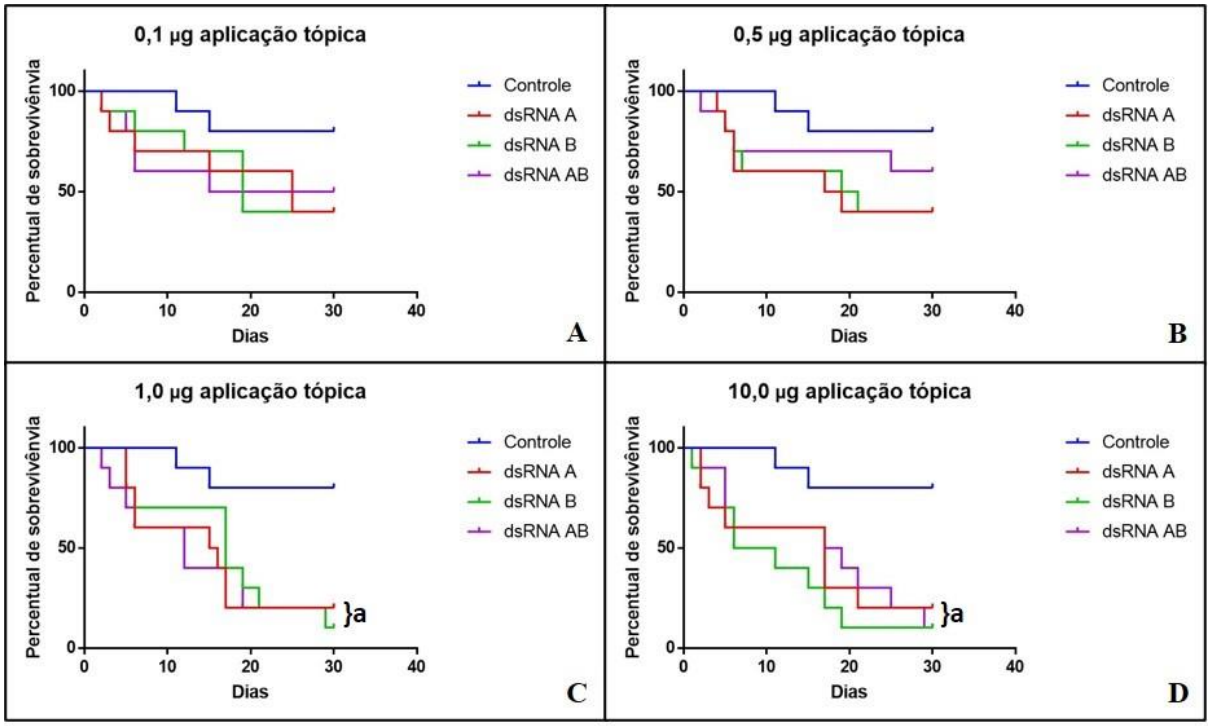


Figura 13. Curva de sobrevivência de insetos tratados de forma tópica com diferentes doses dos dsRNAs, 10 insetos por grupo, no período de 30 dias. As curvas de sobrevivência em azul referem-se ao controle água, em vermelho dsRNA A, em verde dsRNA B e em roxo dsRNA AB. As doses em (A) 0,1 µg; (B) 0,5 µg; (C) 1,0 µg; (D) 10,0µg por inseto. A análise estatística da média de três experimentos independentes, entre os grupos tratado e controle foram feitas utilizando os testes Log-Rank (Mantel-Cox) e Wilcoxon (Gehan), as letras no gráfico representam diferença significativa em relação ao controle (P<0,05).

Tanto no bioensaio de aplicação tópica, quanto no de administração de dsRNA na dieta, para todas as doses de dsRNA utilizadas, pudemos observar duas faixas de mortalidade mais intensas, uma ocorre até o 8º dia e a segunda ocorre entre o 15º e 20º dia após o tratamento. Essas faixas de mortalidade coincidem com a mudança de 3º para 4º estádio de larva e de 6º estádio de larva para o estágio de pupa, respectivamente.

4.5 Fenótipos após o tratamento com RNAi

Os insetos tratados com dsRNA foram acompanhados durante 30 dias, os insetos mortos ou moribundos foram fotografados conforme descrito em Material e Métodos.

O fenótipo de má formação da cutícula das lagartas foi mais evidente até o 5º dia após o tratamento com os diferentes dsRNAs. Na figura 14 são apresentados dois insetos, um tratado com água (controle) e outro tratado com 10 µg de dsRNA A administrado por via tópica. Neste caso é possível observar que houve um notável atraso no crescimento, o escurecimento da cutícula e o extravasamento de corpo gorduroso na altura da cabeça, deformação na cutícula em função da fragilização da mesma. Fenótipo semelhante foi observado para as demais construções, dsRNA B e dsRNA AB.

Figura 14. Fenótipo das lagartas 4 dias após o tratamento por aplicação tópica. (A) Inseto controle tratado com água. (B) inseto tratado com 10µg de dsRNA A. A barra em preto corresponde a 1 cm.

No caso dos insetos tratados com os diferentes dsRNAs (dsRNAs A, dsRNA B e dsRNA AB, após 15 a 20 dias, no período de muda para pupa, foi observado fenótipos semelhantes aos da larva: escurecimento e fragilização da cutícula com sinais de rompimento, em alguns casos. Além disso, foi observado um fenótipo muito interessante de interrupção do desenvolvimento, com a estagnação na mudança entre os estágios de lagarta para pupa. Na figura 15 está apresentado todos os diferentes fenótipos identificados.

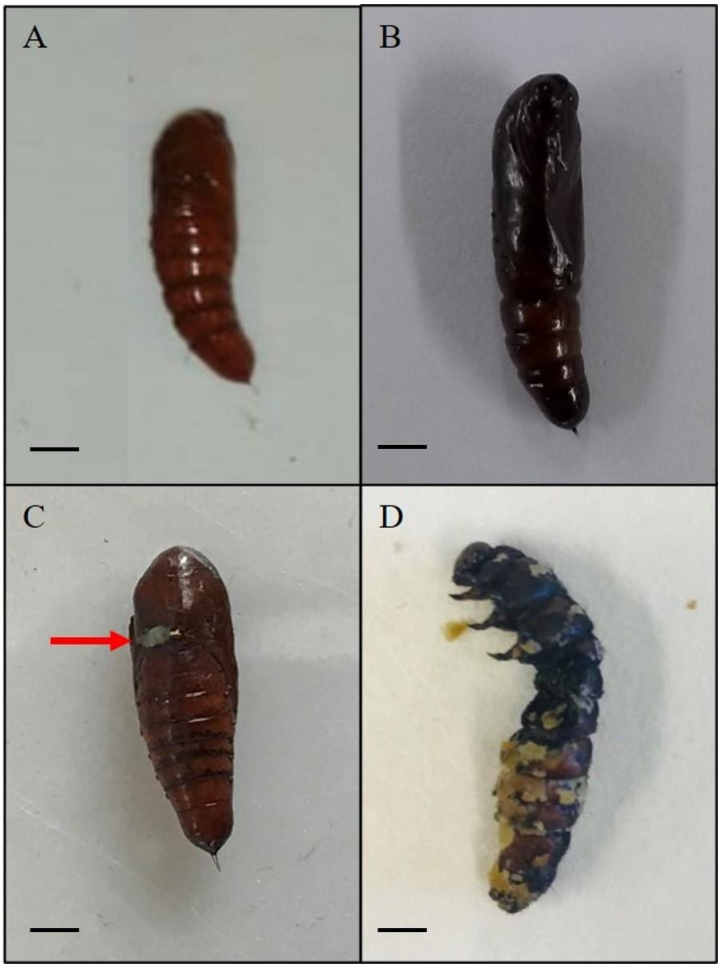


Figura 15. Fenótipo dos insetos após 20 dias de aplicação tópica ou na dieta de construções de dsRNA CHS. Em (A) Pupa tratada com água (controle); (B) Pupa tratada com 10µg de dsRNA A na dieta artificial; (C) Pupa tratada com 10µg de dsRNA AB por aplicação tópica, a seta em vermelho indica ponto de ruptura da cutícula; (D) Inseto tratado com 10µg de dsRNA B por aplicação tópica, observa-se a estagnação entre os estágios de lagarta para pupa. A barra em preto corresponde a 1 cm.

4.6 Análise de expressão gênica após o tratamento com dsRNAs

Considerando que a mortalidade foi mais efetiva em grupos tratados com dsRNA por aplicação tópica, nós decidimos analisar a expressão dos genes *CHSA* e *CHSB*, após o tratamento com dsRNA A, dsRNA B e dsRNA AB administrados de forma tópica. Três grupos de 10 lagartas no estádio L2 foram tratadas por aplicação tópica com 10,0 µg dos dsRNAs anteriormente utilizados, dsRNA sintetizado para o gene da GFP, usado como dsRNA para um gene não relacionado e como controle do veículo foi utilizada água na aplicação tópica. Após 72h de tratamento, 3 insetos de

cada grupo foram utilizados para extração de RNA, seguida da síntese de cDNA e por fim, a expressão de *CHSA* e *CHSB* foram analisadas por qPCR, conforme descrito em Material e Métodos.

Na figura 16 é apresentado o gráfico dos níveis de expressão de *CHSA* nos diferentes grupos tratados, e é possível observar que após 72h de tratamento os níveis de *CHSA* dos grupos GFP e água foram significativamente iguais. Os insetos tratados com dsRNA A sofreram uma redução significativa de aproximadamente 40 % em relação aos grupos controle GFP e água. Nos grupos tratados com dsRNA B e dsRNA AB, os níveis de *CHSA* foram regulados positivamente em relação ao controle GFP, aumentando significativamente em 37 e 59 %, respectivamente.

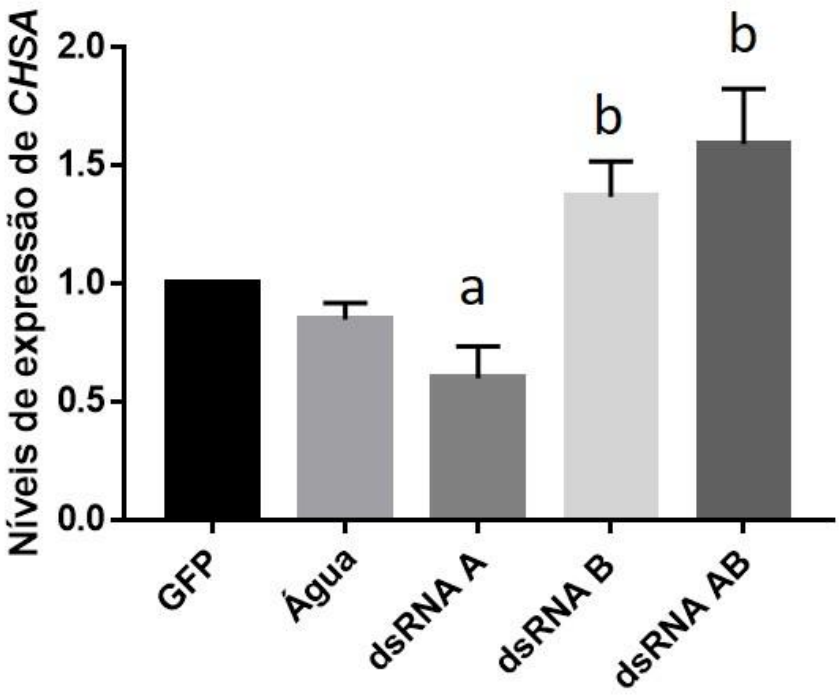


Figura 16. Média dos níveis de expressão de *CHSA* de um total de 9 insetos, 72h após o tratamento por aplicação tópica de dsRNA CHS. Da esquerda para a direita representa os grupos tratados com: 10µg de dsRNA GFP, água, 10µg de dsRNA A, 10µg de dsRNA B e 10µg de dsRNA AB. A barra de erro representa o desvio padrão de 3 experimentos independentes e a análise estatística utilizada foi ANOVA seguida de Tukey. As letras representam significância estatística para P<0,05.

Na figura 17 é apresentado o gráfico dos níveis de expressão de *CHSB* nos diferentes grupos tratados com dsRNA, é possível observar que após 72h de tratamento apenas o grupo tratado com o dsRNA AB sofreu aumento significativo de

80 % nos níveis de *CHSB* em relação ao controle GFP. Os demais grupos não apresentaram diferença significativa na expressão do gene em relação ao controle GFP.

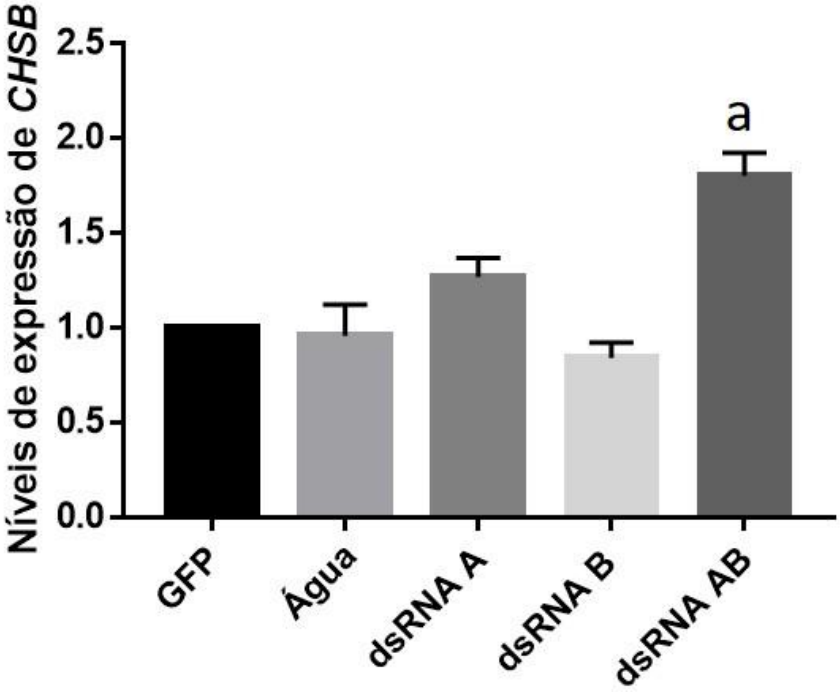


Figura 17. Média dos níveis de expressão de *CHSB* de um total de 9 insetos, 72h após o tratamento por aplicação tópica de dsRNA CHS. Da esquerda para a direita representa os grupos tratados com: 10µg de dsRNA GFP, água, 10µg de dsRNA A, 10µg de dsRNA B e 10µg de dsRNA AB. A barra de erro representa o desvio padrão de 3 experimentos independentes e a análise estatística utilizada foi ANOVA seguida de Tukey. As letras representam significância estatística para P<0,05.

4.7 Avaliação do peso dos insetos após o tratamento

Nos bioensaios nos quais as larvas de *H. armigera* foram tratadas com os dsRNAs tanto por alimentação quanto por aplicação tópica, visualmente os grupos de insetos que receberam dsRNA aparentavam redução de tamanho em relação ao grupo controle. Considerando a hipótese de que se tivesse ocorrido o silenciamento gênico de CHS, o peso dos insetos seria menor, considerando a redução do conteúdo de quitina no inseto tratado. Assim, avaliamos a influência do tratamento com os dsRNAs no peso dos insetos, nós realizamos um segundo bioensaio, e um total de 6

insetos de cada condição de tratamento foram selecionados de forma aleatória e pesados em dois momentos distintos: no 4º estágio de larva e em pupa, 5 e 20 dias após o tratamento com dsRNA respectivamente, conforme descrito em Material e Métodos.

Na figura 18 é apresentado o gráfico da média dos pesos (g) das lagartas dos diferentes grupos, 5 dias após o tratamento com os dsRNAs. Observamos que os grupos controles GFP e água não apresentaram diferenças significativas entre si em relação ao peso. No grupo tratado com 10µg do dsRNA A, houve uma redução significativa do peso em 36% em relação ao grupo controle tratado o dsRNA GFP, que pode ser justificada pelo silenciamento gênico observado na Figura 16. No grupo tratado com o dsRNA B a redução foi de aproximadamente 30% em relação ao controle GFP. E por fim no grupo tratado com o dsRNA AB a redução foi de 38% em relação ao grupo GFP. Nestes dois grupos, apesar da redução significativa dos pesos, os silenciamentos gênicos não foram correlacionados (Fig. 17).

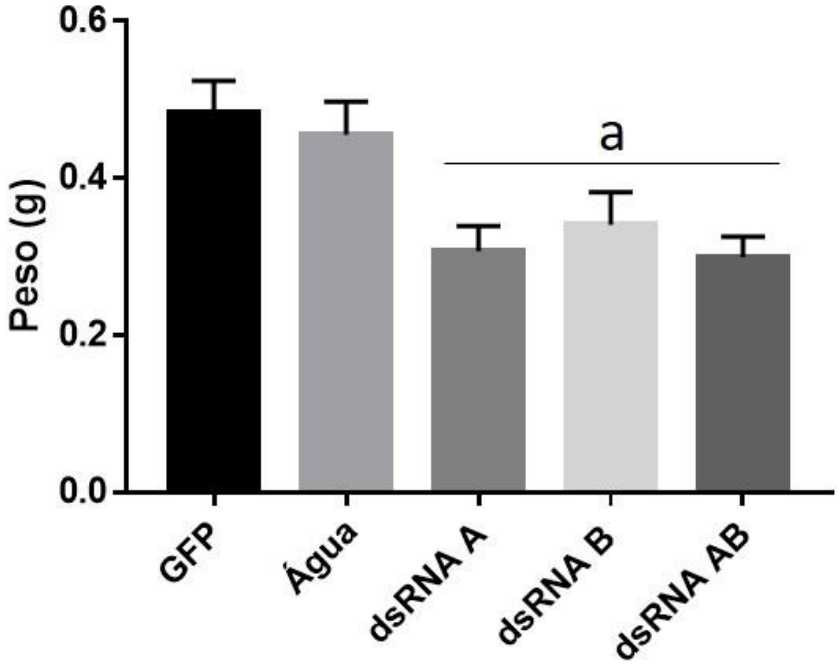


Figura 18. Média dos pesos em gramas de um total de 9 insetos, 5 dias após o tratamento por aplicação tópica. Da esquerda para a direita representa os grupos tratados com: 10µg de dsRNA GFP, água, 10µg de dsRNA A, 10µg de dsRNA B e 10µg de dsRNA AB. A barra de erro representa o desvio padrão de 3 experimentos independentes e a análise estatística utilizada foi ANOVA seguida de Tukey. As letras representam significância estatística para $P<0,05$.

Na figura 19 é apresentado o gráfico da média de peso das pupas dos diferentes grupos, 20 dias após o tratamento. Observamos que os grupos controles GFP e água não apresentaram diferenças significativas entre si em relação ao peso. No grupo tratado com 10µg do dsRNA A, houve uma redução significativa do peso em 37% em relação ao grupo controle tratado o dsRNA GFP. No grupo tratado com o dsRNA B a redução foi de 28% em relação ao controle GFP. E por fim no grupo tratado com o dsRNA AB a redução foi de 18% em relação ao grupo GFP.

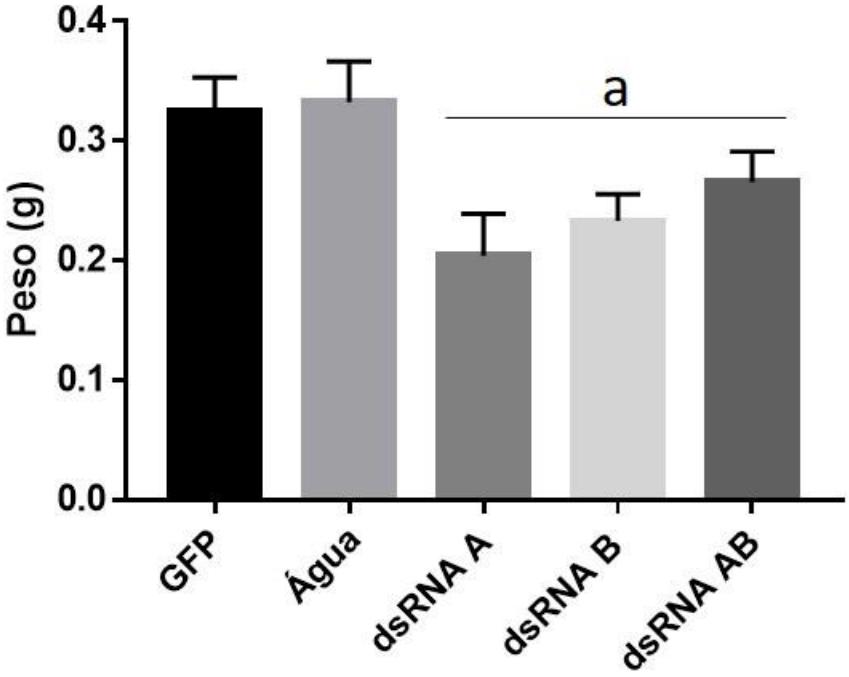


Figura 19. Média do peso em gramas de um total de 9 insetos, 20 dias após o tratamento por aplicação tópica. Da esquerda para a direita representa os grupos tratados com: 10µg de dsRNA GFP, água, 10µg de dsRNA A, 10µg de dsRNA B e 10µg de dsRNA AB. A barra de erro representa o desvio padrão de 3 experimentos independentes e a análise estatística utilizada foi ANOVA seguida de Tukey. As letras representam significância estatística para P<0,05

5. DISCUSSÃO

No atual cenário agrícola com enormes prejuízos causados por insetos-praga, é imprescindível o desenvolvimento de novas tecnologias de controle, visto que, muitas espécies apresentam resistência à inseticidas químicos tradicionalmente utilizados. A *H. armigera* possui características de adaptar-se a diferentes ambientes e hospedeiros com alta proliferação da espécie (FITT, 1989; TAY et al., 2013). Em função disso, apresenta grande potencial de dano, quando seu controle não é realizado de forma adequada.

A base de dados *Arthropod Pesticide Resistance database* (2020) aponta a ocorrência de populações de *H. armigera* resistentes a 48 ingredientes ativos já descritos na literatura. Reforçando assim a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias de controle para este inseto-praga.

O grande potencial do RNAI de interferência no controle de pragas agrícolas tem sido explorado, visto que, insetos, em sua grande maioria, são bastante suscetíveis ao processo. Além disso, o controle por RNAi apresenta-se com alto grau especificidade, podendo ser escolhidas regiões bem distintas do gene como alvo de silenciamento, diminuindo a chance do aparecimento de resistência e ainda podendo ser aplicado de forma modulada.

Diferentes formas de silenciamento gênico por RNAi têm sido avaliadas como tecnologias de grande potencial para serem utilizados no controle de pragas, como a utilização de dsRNA, microRNA, dsRNA Harpin, dentre outras (PRICE & GATEHOUSE, 2008). Entretanto, algumas barreiras ainda dificultam o uso dessa tecnologia, como por exemplo, a escolha de um gene alvo e o método de disponibilização das moléculas que sejam capazes de promover o silenciamento de forma efetiva (PRICE; GATEHOUSE, 2008; ZHANG e al., 2013).

Neste trabalho buscamos avaliar o potencial da tecnologia de RNAi, através da administração de dsRNA como ferramenta de controle da *H. armigera,* tendo como alvo molecular os genes de CHS. Além disso, caracterizamos o perfil de expressão dos genes CHSA e B no ciclo de vida de *H. armigera* e avaliamos duas formas de administração dos dsRNAs distintas: a tópica e na dieta artificial.

Neste estudo nós identificamos duas putativas proteínas CHS no banco de dados do NCBI. O alinhamento dessas proteínas com as CHSs de outros organismos indicaram que a *H. armigera* possui duas CHSs, uma do tipo A e outra do tipo B, observando os domínios conservados, motivos 1-7 (Figura 9), que caracterizam as CHSs, destacando-se as sequências EDR e QRRRW, presente no sítio catalítico que são as assinaturas da proteína (MERZENDORFER, 2006).

Além disso, as sequências encontradas foram utilizadas para determinar teoricamente as massas moleculares e os pontos isoelétricos. Os valores teóricos de massa molecular de 178 e 175 kDa, e de pI 6,56 e 5,92 para CHSA e CHSB, respectivamente encontram-se dentro da faixa de 150-200 kDa para massa molecular teórica para esta classe de proteína e dentro da faixa do ponto isoelétrico, que é levemente ácido (TELLAM, et al, 2000).

Em tese, a localização da região de silenciamento deveria não ter importância para eficiência do mesmo. Entretanto, Ola e colaboradores (2004) relataram que cerca de um em cinco siRNAs selecionados aleatoriamente serão eficazes no silenciamento de seus alvos. Confirmando esta hipótese, Zhang e colaboradores (2010) reportaram evidência a respeito da importância da escolha da região alvo de silenciamento dos genes de CHS em *Anopheles gambiae*, vetor da malária. Neste estudo os autores selecionaram duas regiões como alvo de silenciamento do gene *CHSA* (AgCHS1F1 e AgCHS1F2) e duas regiões do gene *CHSB* (AgCHS2F1 e AgCHS2F2). Eles observaram que a administração das duas construções de dsRNA AgCHS1 foram capazes de silenciar os genes *CHSA* e *CHSB.* Enquanto as duas construções dsRNA AgCHS2 só foram capazes de silenciar o gene *CHSB*. Outra evidência sobre a importância da escolha da região gênica alvo foi reportada por Yang e Han (2013), os autores selecionaram 4 regiões distintas do gene de quitinase de *H. armigera* como alvo de silenciamento. Todas as construções de dsRNA utilizadas foram capazes de silenciar o gene de quitinase, mas, com intensidades diferentes.

Para nosso estudo, a seleção das regiões alvo de silenciamento por RNAi teve como o gene principal a *CHSB,* tendo em vista que este gene está relacionado com a síntese de quitina na matriz peritrófica, localizada intestino e diretamente relacionada com a digestão do inseto, este se alimenta das porções vegetativas e reprodutivas de plantas.

Para o silenciamento de *CHSB* foram selecionadas uma sequência alvo correspondente a região C-terminal do gene (de 4199 a 4314 nt) e uma segunda região correspondente ao domínio catalítico (de 2175 a 2481 nt), uma vez que esta região contempla alta homologia com o gene *CHSA,* tendo a possibilidade de silenciar os dois genes de forma simultânea, como demostrado por Lopez e colaboradores (2019). Para um silenciamento distinto, entre os genes *CHS* de *H. armigera* selecionamos com alvo uma terceira região (de 417 a 561 nt) no *CHSA,* considerando o fato de que, em geral, enzimas semelhantes são mais divergentes em sua porção N-terminal.

Antes de avaliar os efeitos do silenciamento mediado por dsRNA, de forma inédita, nós caracterizamos o perfil de expressão dos genes *CHSA* e *B* em *H. armigera* nas fases de ovo, larva (L1-6) e pupa. Yu e colaboradores (2020) realizaram a identificação e análise funcional dos genes *CHSA* e *B* em *Spodoptera litura*, um lepidóptero filogeneticamente próximo à *H. armigera.* Neste artigo, o perfil de expressão dos genes apresentados nos diferentes estágios de desenvolvimento de *S. litura* é bastante semelhante aos perfis dos genes observados em nosso estudo. Para ambos, observa-se uma elevação dos níveis de transcrito de *CHSA* nos estágios iniciais do desenvolvimento com uma diminuição nos estágios avançados de larva (L5 e L6). Para os genes *CHSB* os perfis também foram semelhantes, sendo que para *H. armigera* foi observado um aumento de expressão do gene em L1, com pico em L2 e chegando à expressão basal em L4. Para *S. litura* o aumento de transcrito de *CHSB* deu-se em L2, com pico em L4, chegando à expressão basal do gene em L5 (Fig. 11 e 12).

Em função do possível uso do RNAi para silenciamento dos genes de *CHS* como ferramenta de controle de *H. armigera*, nós buscamos mimetizar uma aplicação do dsRNA por pulverização, como poderia ser utilizada em cultivos agrícolas. Dessa maneira, as moléculas de dsRNA poderiam adentrar o inseto por meio da cutícula, ou através da ingestão, quando as lagartas se alimentassem do hospedeiro vegetal pulverizado com as moléculas indutoras de silenciamento. Para isso, nós optamos por administrar as diferentes construções do dsRNA para os genes de *CHSA* e *B* de forma tópica na região dorsal da lagarta e também adicionadas em 5 mm^3 de dieta artificial. As construções foram administradas em larvas de 2º estágio considerando os perfis de expressão dos genes de CHS em *H. armigera.*

Para observar os fenótipos em função do silenciamento de *CHSs de H. armigera,* nós utilizamos as doses de 0,1; 0,5; 1,0 e 10,0 µg de dsRNA tanto na administração tópica quanto na dieta.

As doses de 1,0 e 10,0 µg de dsRNA aplicados na dieta promoveram um fenótipo de mortalidade significativo em relação ao controle. A construção dsRNA A promoveu taxa de mortalidade na ordem de 60% para ambas as doses. Na construção dsRNA B, as taxas foram de 60 e 80% para as doses de 1,0 e 10,0 µg, respectivamente. As maiores taxas de mortalidade foram observadas nos períodos de 3 a 5 e 15 a 20 dias após o tratamento, o primeiro período coincide com a mudança entre os estádios larvais de L3-L4, no qual as lagartas se alimentam de forma abundante para o crescimento, necessitando de muita quitina para o desenvolvimento de sua cutícula. O segundo período coincide com a mudança entre os estágios de larva para pupa, neste momento o inseto muda sua morfologia, possivelmente fazendo um *turnover* de quitina, uma vez que não observamos aumento de transcritos de CHS nesta fase. Para a construção dsRNA AB, não foi observado uma mortalidade significativa, a ausência de fenótipo de mortalidade nesta construção pode estar relacionada com a natureza da construção, propriamente dita ou com o fato de que talvez a larva não tenha ingerido suficiente quantidade de dsRNA para a observação do fenótipo. Outro fenótipo observado foi que os insetos tratados com dsRNA A e B diminuíram a taxa de mobilidade em relação ao controle. Na literatura apenas um artigo utiliza o gene *CHSB* como alvo de silenciamento através da alimentação tendo como modelo experimental *H. armigera.* Neste estudo, Jim e colaboradores (2015) utilizaram larvas de 3º estádio de desenvolvimento que foram alimentadas com folhas de tabaco modificadas para expressar dsRNA tendo como alvo a *CHSB*. Os fenótipos de silenciamento observados foram pouca mobilidade no grupo tratado, diminuição significativa do peso e aproximadamente 50% de taxa de mortalidade quando comparado ao grupo controle. Todos esses fenótipos foram semelhantes aos fenótipos encontrados em nosso estudo, tanto para o gene de *CHSA* quanto *CHSB*. Apesar dos autores não correlacionarem o exato período das mortes, foi descrito que ocorreram principalmente nos estágios larvais avançados e próximo a mudança do estágio de larva para pupa, dados estes que corroboram o nosso estudo (Fig. 12).

No bioensaio em que os dsRNAs foram administrados de forma tópica, as doses de 1,0 e 10,0 µg promoveram mortalidade significativa em relação ao controle

para as 3 construções testadas (Fig 13). Na dose 1,0 e 10 µg as construções dsRNA A, dsRNA B e dsRNA AB promoveram uma taxa de mortalidade na ordem de 80-90%, sem diferenças significativas entre as diferentes construções, mas com diferença em relação ao controle. De maneira geral, o gene de *CHSB* encontra-se expresso nas células do intestino (IBRAHIN et al., 2000; ARAKANE et al., 2004, 2005). O fenótipo de mortalidade observado para as construções dsRNA B e dsRNA AB, sugerem que o alcance do dsRNA foi sistêmico, semelhante ao observado por Zhang e colaboradores (2015) para o gene *methionine-rich storage protein gene* (OfSP). Neste trabalho, 3 construções de dsRNA foram desenhadas em regiões distintas do gene *OfSP* (domínio N, domínio C e domínio M), em uma abordagem semelhante ao do nosso trabalho. Os dsRNAs foram aplicados por spray em larvas de *H. armigera* de 1º estádio e foi observado que apenas a construção desenhada para a região do domínio C foi capaz de induzir mortalidade significativa nos dias 1, 3, 5 e 7 após o tratamento. A administração tópica de dsRNA para o domínio C do gene OfSP foi capaz de promover o silenciamento, monitorado por qPCR e que desencadeou a má formação do corpo da larva, destacando-se alteração da cutícula, as outras duas construções de dsRNA para os domínios M e N não foram efetivas. Esses resultados também corroboram os nossos resultados que dependendo da região do gene alvo de silenciamento, os níveis de transcrito assim como a intensidade do fenótipo sofrem alteração.

Os fenótipos de má formação da cutícula foram observados, em nosso estudo, para as 3 construções de silenciamento dsRNA A, dsRNA B e dsRNA AB, tanto na administração tópica quanto na oral. As larvas e pupas que apresentaram coloração escura após o tratamento, morreram antes de emergir como adultos, em geral, com má formação de cutícula. Outro fenótipo frequente foi a pupa permanecer com a coloração normal, mas com defeitos na cutícula devido a fragilização. E um terceiro fenótipo observado foi a estagnação do inseto entre os estágios de larva e pupa (Fig. 14 e 15). Jim e colaboradores (2015), de modo semelhante também silenciaram o gene de *CHSB,* observaram o escurecimento dos insetos, entre o estágio de larva e pupa, que não sobreviveram. Um fenótipo do inseto um pouco diferente foi obtido por Yu e colaboradores (2020), eles silenciaram através de microinjeção os genes de *CHSA* e *B* em *S. litura* com as doses de 3 e 5 µg de dsRNA por inseto. O silenciamento efetivo foi observado para os dois genes com a dose de 5 µg, entretanto, os fenótipos

de má formação e escurecimento de cutícula só foram caracterizados nos insetos silenciados para *CHSA,* apesar do silenciamento efetivo observado no ensaio de qPCR, os insetos tratados com dsRNA *CHSB* não apresentaram fenótipos.

Para comprovar que os fenótipos encontrados em nosso estudo estão relacionados com o silenciamento gênico, nós verificamos os níveis de expressão dos genes CHS por qPCR, 3 dias após o tratamento. Os dsRNAs foram administrados nos insetos por aplicação tópica, uma vez que, esta foi a forma mais efetiva de administração para caracterizar o fenótipo de mortalidade. Neste ensaio as 3 construções de dsRNA foram usadas apenas na dose de 10,0 µg por inseto. A construção dsRNA A foi mais efetiva no silenciamento (Fig. 16), o que justifica os fenótipos de mortalidade e alteração de cutícula observados em larvas e pupas, após o tratamento (Fig. 13, 14 e 15). Além dos fenótipos apresentados, o silenciamento de *CHSA* tem potencial para inviabilizar a prole de *H. armigera*, uma vez que, o dsRNA de *CHSA* de origem parenteral afeta o embrião como demostrado para *Rhodnius prolixus* (MANSUR et al., SOUZA-FERREIRA et al., 2014).

A construção dsRNA B mostra uma tendência ao silenciamento, a qual não foi confirmada com significância estatística quando comparada aos controles (Fig. 17). De modo surpreendente, em nosso trabalho a construção dsRNA AB promoveu uma super expressão do gene na ordem de 80% em relação ao controle GFP (Fig. 17), apesar de ter promovido taxa mortalidade significativa. De modo semelhante, nós observamos que no trabalho de Yu e colaboradores (2020), a dose de 3 µg de dsRNA injetada em *S. litura* também promoveu na ordem de 200% a super expressão do gene *CHSA* e na ordem de 150% a do gene *CHSB*, os autores não discutiram este fenômeno, entretanto, observaram que com o aumento da dose dos dsRNAs injetados (5 µg) foi capaz de promover o efetivo silenciamento gênico dos dois genes de CHS em *S. litura*.

Mais experimentos são necessários para definir a persistência do silenciamento dos genes de *CHS* em *H. armigera* ou caracterizar uma possível super expressão do gene em resposta ao tratamento com dsRNA. Sendo necessário verificar a expressão dos genes ao longo do tempo após o tratamento e a expressão do gene em função das quantidades de dsRNA administradas. Os estudos a respeito das regiões gênicas

alvo de silenciamento também devem ser ampliados para que a escolha de genes alvos para controle de pragas, como proposto neste trabalho, sejam otimizadas.

Sendo o silenciamento gênico de *CHS* efetivo o conteúdo de quitina deve ser alterado, considerando que a massa de quitina é de aproximadamente 30 a 40% do peso do inseto, espera-se que esse silenciamento corresponda a uma diminuição no peso dos insetos. A perda do peso em função da redução do conteúdo de quitina pode estar relacionada com a diminuição da massa de cutícula e/ou em função da desidratação do inseto provocada pela fragilidade cuticular. Após o tratamento tópico com os diferentes dsRNAs na dose de 10,0 µg para silenciamento das *CHSA* e *B* os insetos foram pesados em dois diferentes estágios, as 3 construções reduziram o peso na ordem de 30-38%, 5 dias após o tratamento, quando comparado com o grupo controle tratado com dsRNA GFP, justificando uma provável alteração do peso em função do silenciamento gênico das *CHSs* (Fig. 18). No estágio de pupa também ocorreu a perda de peso, na ordem de 37 e 28% para os tratamentos com dsRNA A e dsRNA B, respectivamente, sugerindo que o gene que foi efetivamente silenciado, no caso da CHSA, o que desencadeou redução no peso. No caso do gene *CHSB* o silenciamento não foi efetivamente comprovado no 3º dia após o tratamento, entretanto, observou-se uma significativa redução dos pesos, no 5º e no 20º dia após o tratamento, o que sugere que o silenciamento possa ter sido efetivo em algum período após o tratamento. De forma curiosa, o grupo tratado com dsRNA AB, no qual foi observado uma super expressão de *CHSB* no estágio de larva, foi o grupo que teve a menor perda de peso, quando comparado com o grupo controle (dsRNA GFP), sugerindo que esta super expressão possa ter contribuído para a diminuição da intensidade do fenótipo de redução do peso.

Todos os resultados aqui apresentados apontam o uso do dsRNA para o silenciamento de CHS, como uma prova de conceito substanciada, de que o RNAi pode ser efetivo para controle da lagarta *H. armigera,* em especial com a administração tópica, pois promoveu uma resposta mais intensa nos fenótipos de mortalidade de larvas e pupas, alteração da cutícula, do peso e escurecimento do tegumento. Este inseto fragilizado em função do silenciamento gênico de CHSA, e possivelmente de CHSB ficaria mais susceptível aos seus inimigos naturais, aos processos de desidratação e injúrias mecânicas em função da redução do conteúdo de quitina, tendo potencial biotecnológico no controle da lagarta. Este estudo deve ser

ampliado para monitorar as doses de dsRNA a serem utilizadas, as construções alvo de silenciamento mais adequadas e o período necessário do tratamento das larvas para um controle efetivo dessa praga agrícola a *H. armigera*.

6. Referências

ABAPA - Associação Baiana Dos Produtores De Algodão. Cartilha – Ações E Manejo Da Helicoverpa Armigera 1p. Disponível Em: http://aiba.org.br/wp-content/uploads/2014/01/cartilha-com-recomendacoes-sobre-o-programa-fitossanitario.pdf (2014).

AGROFIT/MAPA. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Coordenação geral de agrotóxicos e afins. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em julho de 2020.

AHMAD, M., ARIF, M.I., AHMAD, Z., DENHOLM, I. COTTON WHITEFLY (BEMISIA TABACI) resistance to organophosphate and pyrethroid insecticides in Pakistan. Pest. Manag. Sci. 58, 203e208 (2002).

ALI, A., CHOUDHURY, R.A. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. Tunisian Journal Of Plant Protection, Kef, V. 4, N. 1, P. 99- 106 (2009).

ARAKANE, Y. et al. Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development. Insect biochemistry and molecular biology, v. 34, n. 3, p. 291–304, 2004.

ARAKANE, Y. et al. Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Insect biochemistry and molecular biology, v. 38, n. 10, p. 959–962, 2008.

ARAKANE, Yasuyuki et al. The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. Insect molecular biology, v. 14, n. 5, p. 453-463, 2005.

ARAÚJO, A. C. Luta biológica contra *Heliothis armigera* no ecossistema agricola “tomate de industria”. 1990 Dissertação para o Grau de Doutor em Entomologia, Universidade de Évora, Évora, 1990.

ARNEMANN, J. A.; JAMES, W. J.; WALSH, T. K.; GUEDES, J. V. C.; SMAGGHE, G.; CASTIGLIONI, E.; TAY, W. T. Mitochondrial DNA COI characterization of *Helicoverpa*

armigera (Lepidoptera: Noctuidae) from Paraguay and Uruguay. Genetics and Molecular Research, Ribeirão Preto, v. 15, n. 2, 2016.

ARTHROPOD PESTICIDE RESISTNACE DATABASE. *Helicoverpa armigera*. Disponível em: https://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species&arId=41. Acesso em 20 de agosto de 2020.

ÁVILA, J. C.; VIVIAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. Circular técnica. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/caravana/pdfs/final_circular_tecnica_23_cpao(1).pdf. > (2013).

BAUM, J. A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G. R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O. ET AL, control of Coleopteran insect pests through RNA interference. Nature Biotech, 25:1322-1326 (2007).

BEHERE GT, TAY WT, RUSSELL DA, HECKEL DG, APPLETON BR, KRANTHI KR, BATTERHAM P. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to H. zea. Evolutionary Biology 117: 1-10 (2007).

Braga, I. A., & Valle, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. (2007).

BRASIL. Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ato Nº 15 De 14 De Março de 2013. Diário Oficial Da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de mar. 2013. Seção 1.

BRASIL. Decreto nº 24.114 de 12 de abril de 1934: Aprova o regulamento de defesa sanitária vegetal. Diário Oficial da União, 1934.

BUAINAIN, A. M., Alves, E., da Silveira, J. M., & Navarro, Z. (2014). O mundo rural no Brasil do século 21: a formação de um novo padrão agrário e agrícola. Brasília, DF: Embrapa, 2014.

CABI - Centre for Agriculture and Biosciences International. *Helicoverpa armigera* (cotton bollworm): Invasive Species Compendium, 2016. Disponível em: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/26757>. Acesso em: 10 de agosto de 2020.

CARTHEW, R.; Sontheimer, E. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell, v. 136, p. 642-655, 2009.

CEPEA, Mensuração econômica da Incidência de pragas e doenças no Brasil: uma aplicação para as culturas de soja, milho e algodão - Parte 1. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA). Piracicaba - SP. Maio de 2019. Disponível em: https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Cepea_EstudoPragaseDoencas_Parte%201.pdf. Acessado: 19/08/2020

CEPEA. PIB do agronegócio brasileiro. 2020. Disponível em: http://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Planilha_PIB_Cepea_Portugues_Site_atualizada(2).xlsx. Acesso em: 15 de Setembro 2020.

CHRISTIAENS, O.; PRENTICE, K.; PERTRY, I.; GHISLAIN, M.; BAILEY, A.; NIBLETT, C. ET AL, RNA interference: A promising biopesticide strategy against the African sweetpotato weevil *Cylas brunneus*. Nature, Scientific Reports, 6:38836 (2016).

CHRISTINE A. Antisense RNA The Science Creative Quarterly, Issue Three 25-30 (2008).

CUNNINGHAM J. P.; ZALUCKI M. P. Understanding *Heliothine* (Lepidoptera: Heliothinae) pests: What is a host plant? Journal of Economic Entomology 107: 881–896 (2014).

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

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

EL-LISSY, O. Detection of old world bollworm (Helicoverpa armigera) in Florida. 2015. Disponível em: https://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/owb/downloads/DA-2015-43.pdf. Acesso em 8 de agosto de 2020.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION (EPPO). Data sheets on quarantine organisms nº 110: *Helicoverpa armigera*. Paris: EPPO, 1981. (Bulletin, 11).

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

FITT, G. P. The ecology of Heliothis in relation to agroecosystems. Annual review of entomology, Palo Alto, v. 34, p. 17-52 (1989).

FORRESTER, N.W., CAHILL, M., BIRD, L.J., LAYLAND, J.K. Management of pyrethroid and endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. Bull. Entomol. Res. Suppl. 1, 1-132 (1993).

FROZZA, A. 2013. *Helicoverpa armigera*: conheça a lagarta e veja ações de manejo para combatê-la. Disponível em: http://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/helicoverpa-armigera-conheca-lagarta-veja-acoes-manejo-para-combate-la-26928>. Acesso em 27 de agosto de 2020.

GILLIGAN, T. M. & S. C. Passoa. 2014. LepIntercept, An identification resource for intercepted Lepidoptera larvae. Identification Technology Program (ITP), USDA-APHIS-PPQ-S&T, Fort Collins, CO. [accessed at http://www.idtools.org/id/leps/lepintercept].

GUEDES, J. V. C.; ARNEMANN, J. A.; PERINI, C. R.; ARRUÈ, A.; ROHRIG, A. Manejar ou Perder. Revista Cultivar Grandes Culturas, Pelotas, N. 176, P. 12-16 (2013).

HARDWICK, D. F. The corn earworm complex. Memoirs of the Entomological Society of Canada, Ottawa, v. 40, p. 1-247, (1965).

HAYDEN JE & Brambila J (2015). Pest alert: the Old World bollworm. Disponível em: https://www.fdacs.gov/ezs3download/download/61696/1411969/Media/Files/Plant-Industry-Files/Pest-Alerts/PEST%20ALERT%20Helicoverpa%20armigera-1.pdf. Acesso em 6 de agosto de 2020.

HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of Rnai for pest control: A review. Journal Insect Physiology, 56: 227-235 (2010).

IBRAHIM, Ghada H. et al. Cloning and characterization of a chitin synthase cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. Insect biochemistry and molecular biology, v. 30, n. 12, p. 1213-1222, (2000).

JACOBS-LORENA, M. and Oo, M.M.. The peritrophic matrix of insects. The Biology of Disease Vectors. 1st edition. Edited by Beaty, B.J. & Maequardt, W.C.. Colorado: University Press of Colorado. pp. 318-332, (1996).

JAYARAJ, S., REED, W., KUMBLE, V. Biological and ecological studies of Heliothis. in Proceedings of the International Workshop On Heliothis Management. Icrisat Center, International Crops Research Institute For The Semi-Arid Tropics. Patancheru, India, 15-20 November, P. 17-28 (1981).

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

JOGA, Mallikarjuna R. et al. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. Frontiers in physiology, v. 7, p. 553, (2016).

KARIM, S. Management of *Helicoverpa armigera*: a review and prospectus for Pakistan. Pakistan Journal of Biological Sciences, Faisalabad, v. 3, n. 8, p.1213- 1222, (2000).

KIM, V. Narry; HAN, Jinju; SIOMI, Mikiko C. Biogenesis of small RNAs in animals. Nature reviews Molecular cell biology, v. 10, n. 2, p. 126-139, (2009).

KOLA VS, RENUKA P, MADHAV MS, MANGRAUTHIA SK. Key enzymes and proteins of crop insects as candidate for RNAi based gene silencing. Front Physiol. 2015;6:119 (2015).

KRAMER K. J. & MUTHUKRISHNA N, S. Chitin metabolism in insects: a revisit. In: Gilbert l., i., Iatrou k., and Gill, s. (ed.). Comprehensive molecular insect science. [s.l.] Elsevier press, Oxford, UK, (2005).

KRAMER, Karl J.; HOPKINS, Theodore L.; SCHAEFER, Jacob. Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 25, n. 10, p. 1067-1080, (1995).

KRITICOS, Darren J. et al. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: is it just a matter of time?. PLoS One, v. 10, n. 3, p. e0119618, 2015.

LAMMERS, J. W.; MACLEOD, A. Report of a pest risk analysis: *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808). (2007).

LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J.; YEOM, K. H.; LEE, S.; BAEK, S. H.; KIM, V. N. Microrna genes are transcribed by RNA polymerase II. Embo, 23, 4051-4060 (2004).

LEHANE, M. J. Formation and histochemical structure of the peritrophic membrane in the stablefly, *Stomoxys calcitrans*. Journal of insect physiology, v. 22, n. 11, p. 1551-1557, (1976).

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. Annual review of entomology, v. 42, n. 1, p. 525-550, (1997).

LEITE, Natália A. et al. Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. PloS one, v. 9, n. 11, p. e113286, (2014).

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. methods, v. 25, n. 4, p. 402-408, (2001).

LOPES-DA-SILVA, M.; SANCHES, M.M.; STANCIOLI, A.R.; ALVES, G.; SUGAYAMA, R. The role of natural and human mediated pathways for invasive agricultural pests: a historical analysis of cases from Brazil. Agricultural Sciences, v.5, p.634-646, (2014).

LOPEZ, S.B.G., GUIMARÃES-RIBEIRO, V., RODRIGUEZ, J.V.G. ET AL. RNAi-based bioinsecticide for *Aedes* mosquito control. Sci rep 9, 4038 (2019).

MANSUR, Juliana F. et al. The effect of lufenuron, a chitin synthesis inhibitor, on oogenesis of *Rhodnius prolixus*. Pesticide Biochemistry and physiology, v. 98, n. 1, p. 59-67, (2010).

MANSUR, JULIANA F.; ALVARENGA, EVELYN S.L.; FIGUEIRA-MANSUR, JANAINA; FRANCO, THIAGO A. ET AL. Effects of chitin synthase double-stranded RNA on molting and oogenesis in the chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 51, p. 110-121, (2014).

MARTIN, T., OCHOU, G.O., VAISSAYRE, M., FOURNIER, D. Organophosphorus insecticides synergize pyrethroids in the resistant strain of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. J. Econ. Entomol. 96, 468e474 (2003).

MATTHEWS, M. Heliothine moths of Australia: a guide to pest bollworms and related noctuid groups. Tropical Lepidoptera, Melbourne, v. 10, n. 2, p. 50, (1999).

MEISTER, GUNTER & TUSCHL, THOMAS. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature 431, 343-349. Nature. 431. 343-9 (2004).

MERZENDORFER H. & LARS Z. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. J exp biol., v. 24, p. 4393–412 (2003).

MERZENDORFER H. Insect chitin synthases: a review. J. Comp. Physiol. B, v. 176, p. 1–15, (2006).

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. CTNBio, Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018.

MOREIRA MF, DOS SANTOS AS, MAROTTA HR, MANSUR JF, RAMOS IB, MACHADO EA, ET AL. A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. Insect Biochem Mol Biol., v. 37, n. 12, p. 1249–61 (2007).

MURÚA, M. G. et al. First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. Florida Entomologist, Lutz, v. 97, n. 2, p. 854-856, (2014).

NAGAHASHI, S., SUDOH, M., ONO, N., SAWADA, R., YAMAGUCHI, E., UCHIDA, Y., MIO, T., TAKAGI, M., ARISAWA, M., YAMADA-OKABE, H. Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*: implication of two highly conserved domains as possible catalytic sites. J. Biol. Chem. 270, 13961–13967 (1995).

NARVA, K. E.; SIEGFRIED, B. D.; STORER, N. P. Transgenic approaches to western corn rootworm control. Advances in biochemical engineering/biotechnology, 136, 135-162. (2013).

NASERI B, FATHIPOUR Y, MOHARRAMIPOUR S, HOSSEININAVEH V. Comparative reproductive performance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) reared on thirteen soybean varieties. Journal of agricultural science and technology 13: 17-26 (2011).

NEVILLE, A. C.; PARRY, D. A.; WOODHEAD-GALLOWAY, J. The chitin crystallite in arthropod cuticle. Journal of cell science, v. 21, n. 1, p. 73-82, (1976).

PARAGUAY. Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal (Senave). Paraguay: Asunción. 2013. Disponível em: http://www.abc.com.py/edicion-impresa/economia/senave-en-alerta-tras-ingreso-de-peligrosa-plaga-agricola-629240.html. Acesso em 12 de agosto de 2020.

PETERS, W.. Peritrophic Membranes, In: Zoophysiology. 30: 1-238, (1992).

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

QUEIROZ-SANTOS, L.; CASAGRANDE, M. M.; SPECHT, A. Morphological characterization of *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae). Neotropical entomology, v. 47, n. 4, p. 517-542, (2018).

RANGEL, Luís Eduardo Pacifici. Perdas e danos para o agronegócio. Agroanalysis, v. 35, n. 5, p. 30-31, (2015).

REED, W. *Heliothis armigera* (hb.) (Noctuidae) in western Tanganyika: II. Ecology and natural and chemical control. Bulletin of entomological research, London, v. 56, n. 1, p. 127-140 (1965).

RICHARDS, A. Glen. The chemistry of insect cuticle. (1978).

RUI, C.H., MENG, X.Q., FAN, X.L., LIANG, G.M., LI, Y.P. Resistance to insecticides in *Helicoverpa armigera* in Hebei, Henan, Shandong and Xinjiang. Acta phytopar. Sin. 26, 260-264 (1999).

SEMIZAROV, D., FROST, L., SARTHY, A., KROEGER, P., HALBERT, D. N., FESIK, S. W. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. Proc. Proc. Natl. Acad. Sci. A, v. 27, p. 6347–6352. (2003).

SMITH, E. Detection of old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Puerto Rico. North American plant protection organization, phytosanitary alert system bulletin. (Acesso em agosto de 2020: https://www.pestalerts.org/official-pest-report/detection-old-world-bollworm-helicoverpa-armigera-puerto-rico) (2014)

SNØVE JR, Ola et al. Designing effective siRNAs with off-target control. Biochemical and biophysical research communications, v. 325, n. 3, p. 769-773, (2004).

SOUZA-FERREIRA P.S., MANSUR J. F., BERNI M., M. M. F. Chitin deposition on the embryonic cuticle of *Rhodnius prolixus*: the reduction of CHS transcripts by CHS-dsRNA injection in females affects chitin deposition and eclosion of the first instar nymph. Insect biochemistry and molecular biology, v. 51, p. 101–109 (2014).

TAY WT, SORIA MF, WALSH T, THOMAZONI D, SILVIE P, GAJANAN TB, CRAIG A, SHARON D. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. Plos one 8:1-7 (2013).

TELLAM, Ross L. et al. Insect chitin synthase: cDNA sequence, gene organization and expression. European journal of biochemistry, v. 267, n. 19, p. 6025-6043, 2000.

TELLAM, Ross L.; EISEMANN, Craig. Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. Insect biochemistry and molecular biology, v. 30, n. 12, p. 1189-1201, 2000.

THOMAZONI, D., SORIA, M. F., PEREIRA, E. J. G., DE GRANDE, P. E. *Helicoverpa armigera*: perigo iminente aos cultivos de algodão, soja e milho do estado de mato grosso. Instituto Mato-grossense do algodão, circular técnica, n.5, 12 p (2013).

TIMMERMANN, S. E.; BRIEGEL, H. Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. Journal of Insect Physiology, v. 45, n. 5, p. 461-470, 1999.

VASCONCELOS, Y. Genes em silêncio. Revista pesquisa FAPESP, Ed. 268 (2018).

WIGGLESWORTH, V. B. Memoirs: the formation of the peritrophic membrane in insects, with special reference to the larvae of mosquitoes. Journal of Cell Science, v. 2, n. 292, p. 593-616, 1930.

XUE, X.-Y., MAO, Y.-B., TAO, X.-Y., HUANG, Y.-P., CHEN, X.-Y. New approaches to agricultural insect pest control based on RNA interference. Adv. Insect Physiol. 42, 73 (2012).

YANG, Jing; HAN, Zhao-jun. Optimisation of RNA interference-mediated gene silencing in *Helicoverpa armigera*. Austral Entomology, v. 53, n. 1, p. 83-88, 2014.

YU, Hai-Zhong et al. Identification and Functional Analysis of Two Chitin Synthase Genes in the Common Cutworm, *Spodoptera litura*. Insects, v. 11, n. 4, p. 253, 2020.

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

ZHANG, Hao et al. Lepidopteran insect species-specific, broad-spectrum, and systemic RNA interference by spraying dsRNA on larvae. Entomologia Experimentalis et Applicata, v. 155, n. 3, p. 218-228, 2015.

Zhang, J.; Khan, S.A.; Heckel, D.G.; Bock, R. Next-Generation Insect-Resistant Plants: RNAi-Mediated Crop Protection. Trends in Biotechnology, v. 35, p. 871-882, 2017.

ZHANG, X.; ZHANG, J.; ZHU, K. Y. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). Insect molecular biology, v. 19, n. 5, p. 683-693, 2010.

ZHU, K.Y.; Merzendorfer, H.; Zhang, W.; Zhang, J.; Muthukrishnan, S. Biosynthesis, turnover, and functions of chitin in insects. Annual Review of Entomology, v. 61, p. 177-196, 2016.

ZHU, Yu-Cheng et al. Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding a putative epidermal chitin synthase of *Manduca sexta*. Insect biochemistry and molecular biology, v. 32, n. 11, p. 1497-1506, 2002.

ZIMOCH L, HOGENKAMP DG, KRAMER KJ, MUTHUKRISHNAN S, MERZENDORFER H. Regulation of chitin synthesis in the larval midgut of manduca sexta. Insect biochem mol biol. (2005).