



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOAN BRIGO FERNANDES

**ESTABELECIMENTO DE UM MÉTODO PARA EMPREGO DE
dsRNA VISANDO CONTROLE E ESTUDOS FUNCIONAIS
VIA SILENCIAMENTO GÊNICO EM PERCEVEJO-MARROM
Euschistus heros (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae)**

JOAN BRIGO FERNANDES

**ESTABELECIMENTO DE UM MÉTODO PARA EMPREGO DE dsRNA
VISANDO CONTROLE E ESTUDOS FUNCIONAIS VIA
SILENCIAMENTO GÊNICO EM PERCEVEJO-MARROM *Euschistus
heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Amarildo Pasini

Coorientadora: Pesq. Dra. Francismar Correa
Marcelino Guimarães

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Fernandes, Joan Brigo.

Estabelecimento de um método para emprego de dsRNA visando controle e estudos funcionais via silenciamento gênico em percevejo-marrom *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae) / Joan Brigo Fernandes. - Londrina, 2019.
65 f. : il.

Orientador: Amarildo Pasin.

Coorientador: Francismar Corrêa Marcelino Guimarães.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Pragas agrícolas - Controle - Tese. 2. Soja - Doenças e pragas - Tese. 3. Percevejo (Inseto) - Tese. I. Pasin, Amarildo. II. Guimarães, Francismar Corrêa Marcelino. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

JOAN BRIGO FERNANDES

**ESTABELECIMENTO DE UM MÉTODO PARA EMPREGO DE dsRNA
VISANDO CONTROLE E ESTUDOS FUNCIONAIS VIA
SILENCIAMENTO GÊNICO EM PERCEVEJO-MARROM *Euschistus
heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Amarildo Pasini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Pesq. Dra. Francismar Corrêa Marcelino
Guimarães
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –
EMPBRAPA

Profa. Da. Maria Paula Barion Alves Nunes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Gabriela Vieira Silva
Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL

Londrina, 28 de fevereiro de 2019.

À minha querida esposa Kellen, por toda a compreensão e apoio nesta fase, aos meus filhos Renan, Arthur e João, pela paciência e pelo tempo cedido para que eu desenvolvesse os estudos e projeto. Com todo amor e carinho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por estar presente em todos os momentos, me dando força e equilíbrio para superar todas as adversidades.

Aos meus pais, José Carlos e Maria Luzia e à minha sogra Maria e sogro Claudemir que sempre estavam presentes, com palavras de apoio ou cuidando dos netos quando preciso.

À minha esposa Kellen e meus filhos Renan, Arthur e João, por toda paciência e compreensão nos momentos de tensão e auxílio com carinho e atenção às minhas dificuldades. Agradeço também pelo tempo cedido para as atividades.

Ao professor Dr. Amarildo Pasini, pela orientação e pela grande oportunidade de participar do Programa de Mestrado, aos ensinamentos, dicas, conselhos e amizade que, com certeza, desempenharam um grande papel para meu desenvolvimento.

À Dra. Francismar Corrêa Marcelino Guimarães e Dr. Samuel Roggia, por todo o suporte e orientações oferecidas na condução do projeto, desenvolvido na Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, em Londrina/PR e pelo acesso a esta excelente área, que acresce importância para minha formação profissional.

A todos os funcionários dos laboratórios de Entomologia, Criação e Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, e aos amigos que fiz em especial Rafael Bruno Guayato Nomura e Valéria Lopes Caitar, que me ajudaram com ensinamentos e palavras de apoio no desenvolvimento dos experimentos.

À Daniele Santos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) que sempre estava disponível a ajudar com valiosas informações e protocolos de voltados à Entomologia.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), em especial aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela contribuição para a minha formação profissional e pessoal.

Aos membros da banca, pelas contribuições oferecidas para a condução deste trabalho.

A todas as pessoas que colaboraram em algum momento para a realização deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus amigos, que estavam sempre motivando estas conquistas e são muito importantes para minha vida.

Todo meu carinho e agradecimento!

“Se fui capaz de ver mais longe,

é porque me apoiei

em ombros de gigantes”

(Sir Isaac Newton)

FERNANDES, J. B. **Estabelecimento de um método para emprego de dsRNA visando controle e estudos funcionais via silenciamento gênico em percevejo-marrom *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae)**. 2019. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O percevejo-marrom *Euschistus heros* é considerado uma das principais pragas da soja, gerando prejuízos significativos na produtividade e qualidade dos grãos. O silenciamento gênico, processo biológico explorado via ferramentas biotecnológicas e comumente conhecido como RNA interferente (RNAi), tem se mostrado uma alternativa eficiente e seletiva para o controle de pragas, via silenciamento de genes essenciais. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um método para estudos funcionais e controle de *E. heros* via silenciamento gênico pós-transcricional. A estabilidade, permanência e doses foram testadas em diferentes metodologias de fornecimento das moléculas indutoras de silenciamento via alimentação oral e contato. A fim de determinar e validar absorção e estabilidade do dsRNA, foram realizadas padronizações utilizando-se moléculas de *double stranded* RNA (dsRNA) similar ao gene *Green Fluorescent* (GFP), via alimentar, com vagens de soja e dsRNA translocado e através de contato com solução contendo dsRNA. Após confirmação, foi utilizado o gene *act-1* para expressar o silenciamento através da absorção de dsRNA *act-1*. Através do método via contato obteve-se 30% de silenciamento em 24 horas e via alimentação com vagens de soja translocadas gerou 50% de mortalidade com dsact-1 e com adição de protetor EDTA, obteve-se 65% de mortalidade ambos em 96 horas. Observou-se que, os métodos de contato e alimentação via vagens de soja foram eficientes para estudos funcionais, sendo o de contato através de solução com dsRNA, considerado mais prático e aplicável, sendo o de mais rápida reação e o alimentação via vagem de soja com alta mortalidade.

Palavras-chave: Controle de pragas. RNA interferente. Seletividade. *Glycine max*.
Pragas da soja.

FERNANDES, J. B. **Establishment of a method for delivery of dsRNA for control and functional studies via genic silence in neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae).** 2019. 65 p. Dissertation (Master's degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros* is considered one of the main pests of soybeans, causing significant losses in grain yield and quality. Gene silencing, a biological process explored via biotechnological tools and commonly known as interfering RNA (RNAi), has been shown to be an efficient and selective alternative for pest control through the silencing of essential genes. The objective of this work was to establish a control method and for functional studies for *E. heros* via post-transcriptional gene silencing. The stability, permanence and doses were tested in different methodologies of supply of the mutant induction molecules via oral and contact feeding. In order to determine and validate dsRNA uptake and stability, standardizations were performed using food gs dsRNA using soybean pods with translocated dsRNA and through contact with dsRNA containing solution. After confirmation, the act-1 gene was used to express the silencing by the absorption of dsRNA act-1. By means of the contact method, 30% of silencing was achieved in 24 hours and feeding with translocated soybeans generated 50% mortality with dsact-1 and with addition of EDTA protector, 65% mortality was achieved both in 96 hours . It was observed that, both methods, are efficient for functional studies, being that of contact through solution with dsRNA, considered more practical and applicable, being the one of more rapid reaction.

Key words: Control of pests. RNA interference. Selectivity. Soybean pests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Total de área plantada e produção de soja no Brasil (CONAB, 2017).....	17
Figura 2.	Ciclo do desenvolvimento do percevejo-marrom (CIVIDANES, 1992).....	18
Figura 3.	Sementes de soja, com problemas de lesões de danos de percevejo identificados pelo teste de tetrazólio, submetidas ao período de pré-condicionamento de 6 horas/41°C. Londrina, PR, 2007 (Costa et al, 2007).....	19
Figura 4.	Via de geração de siRNAs e silenciamento gênico em <i>Caenorhabditis elegans</i> (ROSSO; JONES; ABAD, 2009).....	24
Figura 5.	Amplificação do sinal de siRNA pela enzima RNA-polimerase RNA-dependente (RdRP) (WATSON et al., 2015).....	24
Figura 6.	Detalhamento das secções avaliadas para translocação de dsRNA.....	38
Figura 7.	Detecção da molécula de dsRNA-GPF após aplicação ectópica em percevejo-marrom. Amostras de percevejos administrados dsRNA via oral (PA) e contato dorsal (PG) onde PA 1 = percevejo alimentado repetição 1; PA 2 = percevejo alimentado repetição 2; PA 3 = percevejo alimentado repetição 3; PA 4 = percevejo alimentado repetição 4; PA 5 = percevejo alimentado repetição 5; PA 6 = percevejo alimentado repetição 6; PA 7 = percevejo alimentado repetição 7; PA 8 = percevejo alimentado repetição 8; PA 9 = percevejo alimentado repetição 9; PA 10 = percevejo alimentado repetição 10; PG 1 = percevejo contato dorsal repetição 1; PG 2 = percevejo contato dorsal repetição 2; PG 3 = percevejo contato dorsal repetição 3; PG 4 = percevejo contato dorsal repetição 4.....	43

Figura 8. Degradação de dsRNA GFP por amostras de proteínas totais, em percevejo inteiro de 3º instar (NI 3) sendo NI 3/0 = Ninfas de 3º instar inteiras íntegra; NI 3/5 = Ninfas de 3º instar inteiras diluição 1:5; NI 3/25 = Ninfas de 3º instar inteiras diluição 1:25; NI 3/125 = Ninfas de 3º instar inteiras diluição 1:125; NI 3/625 = Ninfas de 3º instar inteiras diluição 1:625; NI 3- = Controle Negativo; Hemolinfa de adultos (HEA) sendo HEA/0 = Hemolinfa de Adultos íntegra; HEA/5 = Hemolinfa de Adultos diluição 1:5; HEA/25 = Hemolinfa de Adultos diluição 1:25; HEA/125 = Hemolinfa de Adultos diluição 1:125; HEA/625 = Hemolinfa de Adultos diluição 1:625; HEA - = Controle Negativo; e sistema digestivo de adultos (SDA) sendo SDA/0 = Sistema digestivo de adultos íntegro; SDA/5 = Sistema digestivo de adultos diluição 1:5; SDA/25 = Sistema digestivo de adultos diluição 1:25; SDA/125 = Sistema digestivo de adultos diluição 1:125; SDA/625 = Sistema digestivo de adultos diluição 1:625.44

Figura 9. Saturação de dsRNA GFP em percevejos adultos via contato dorsal com concentrações de 50 µg, 100 µg e 200 µg. Sendo 50.1 = 50 µg repetição 1; 50.2 = 50 µg repetição 2; 50.3 = 50 µg repetição 3; 50.4 = 50 µg repetição 4; 50.5 = 50 µg repetição 5; 50.6 = 50 µg repetição 6; 50.7 = 50 µg repetição 7; 50.8 = 50 µg repetição 8; 50.9 = 50 µg repetição 9; 50.10 = 50 µg repetição 10; 100.1 = 100 µg repetição 1; 100.2 = 100 µg repetição 2; 100.3 = 100 µg repetição 3; 100.4 = 100 µg repetição 4; 100.5 = 100 µg repetição 5; 100.6 = 100 µg repetição 6; 100.7 = 100 µg repetição 7; 100.8 = 100 µg repetição 8; 100.9 = 100 µg repetição 9; 100.10 = 100 µg repetição 10; 200.1 = 200 µg repetição 1; 200.2 = 200 µg repetição 2; 200.3 = 200 µg repetição 3; 200.4 = 200 µg repetição 4; 200.5 = 200 µg repetição 5; 200.6 = 200 µg repetição 6; 200.7 = 200 µg repetição 7; 200.8 = 200 µg repetição 8; 200.9 = 200 µg repetição 9; 200.10 = 200 µg repetição 10.45

Figura 10. Vagens de soja seccionadas com translocação de dsRNA GFP. VX 1.1 vagem 1 secção 1, VX 1.2 vagem 1 secção 2, VX 1.3 vagem 1 secção 3, VX 2.1 vagem 2 secção 1, VX 2.2 vagem 2 secção 2, VX 2.3 vagem 2 secção 3, VX 3.1 vagem 3 secção 1, VX 3.2 vagem 3 secção 2, VX 3.3 vagem 3 secção 3, VX 4.1 vagem 4 secção 1, VX 4.2 vagem 4 secção 2, VX 4.3 vagem 4 secção 3, VX 5.1 vagem 5 secção 1, VX 5.2 vagem 5 secção 2, VX 5.3 vagem 5 secção 3.46

Figura 11. Translocação de dsRNA GFP em sementes das vagens com absorção via xilema. Sendo S1.1 = semente vagem 1 secção 1; S1.2 = semente vagem 1 secção 2; S1.3 = semente vagem 1 secção 3; S2.1 = semente vagem 2 secção 1; S2.2 = semente vagem 2 secção 2; S2.3 = semente vagem 2 secção 3; S3.1 = semente vagem 3 secção 1; S3.2 = semente vagem 3 secção 2; S3.3 = semente vagem 3 secção 3; S4.1 = semente vagem 4 secção 1; S4.2 = semente vagem 4 secção 2; S4.3 = semente vagem 4 secção 3; S5.1 = semente vagem 5 secção 1; S5.2 = semente vagem 5 secção 2; S5.3 = semente vagem 5 secção 3.47

Figura 12. Percevejos alimentados em vagens contendo dsRNA GFP translocado. Sendo 1-1 = percevejo na vagem 1 repetição 1; 1-2 = percevejo na vagem 1 repetição 2; 1-3 = percevejo na vagem 1 repetição 3; 1-4 = percevejo na vagem 1 repetição 4; 2-1 = percevejo na vagem 2 repetição 1; 2-2 = percevejo na vagem 2 repetição 2; 2-3 = percevejo na vagem 2 repetição 3; 2-4 = percevejo na vagem 2 repetição 4; 3-1 = percevejo na vagem 3 repetição 1; 3-2 = percevejo na vagem 3 repetição 2; 3-3 = percevejo na vagem 3 repetição 3; 3-4 = percevejo na vagem 3 repetição 4; 4-1 = percevejo na vagem 4 repetição 1; 4-2 = percevejo na vagem 4 repetição 2; 4-3 = percevejo na vagem 4 repetição 3; 4-4 = percevejo na vagem 4 repetição 4.48

Figura 13.	Translocação de dsRNA GFP em sementes das vagens com absorção via xilema do Tratamento 1 (50µg/300µL dsRNA GFP). Sendo S V1 = sementes da vagem 1; S V2 = sementes da vagem 2; S V3 = sementes da vagem 3; S V4 = sementes da vagem 4; S V5 = sementes da vagem 5; S V6 = sementes da vagem 6; S V7 = sementes da vagem 7; S V8 = sementes da vagem 8; S V9 = sementes da vagem 9.	49
Figura 14.	Percevejos alimentados em vagens do Tratamento 1 (50µg/300µL dsRNA GFP). Sendo P1 24h = percevejo repetição 1 com coleta em 24h; P2 24h = percevejo repetição 2 com coleta em 24h; P3 24h = percevejo repetição 3 com coleta em 24h; P1 48h = percevejo repetição 1 com coleta em 48h; P2 48h = percevejo repetição 2 com coleta em 48h; P3 48h = percevejo repetição 3 com coleta em 48h.....	49
Figura 15.	Expressão do gene <i>act-1</i> em percevejo marrom de 4º ínstar, 5º ínstar e Adulto.	50
Figura 16.	Expressão do gene <i>act-1</i> no percevejo-marrom em contato com dsRNA onde dsGFP = Controle com água + dsRNA GFP (1); dsact1 = água + dsRNA act-1 (0,70); dsact1+EDTA = água + dsRNA act-1 + EDTA (0,88). Médias seguidas de * diferem a $P < 0,05$	51
Figura 17.	Expressão do gene <i>act-1</i> no percevejo-marrom alimentados em vagens translocadas com dsRNA onde dsGFP = Controle com água + dsRNA GFP; dsact1 = água + dsRNA act-1; dsact1+EDTA = água + dsRNA act-1 + EDTA. Em dois tempos de coleta (24h e 48h). Médias seguidas de * diferem a $P < 0,05$	52
Figura 18.	Mortalidade do percevejo-marrom alimentado em vagens translocadas com dsRNA onde T1 = Controle com água + dsRNA GFP; T2 = água + dsRNA act-1; T3 = água + dsRNA act-1 + EDTA.....	54

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Aspectos econômicos da sojicultura	17
2.2	<i>Euschistus heros</i> (Fabricius)	18
2.3	Controle de insetos-praga	20
2.4	RNA Interferente	22
2.5	RNA interferente para o controle de pragas	26
3	ARTIGO: MÉTODO PARA EMPREGO DE dsRNA VISANDO CONTROLE E ESTUDOS FUNCIONAIS VIA SILENCIAMENTO GÊNICO EM PERCEVEJO-MARROM	30
3.1	Resumo	30
3.2	Abstract	31
3.3	Introdução	32
3.4	Objetivo	34
3.4.1	Objetivos específicos	35
3.5	Material e Métodos	35
3.5.1	Obtenção do percevejo <i>Euschistus heros</i>	35
3.5.2	Determinação do tempo de restrição alimentar	35
3.5.3	Padronização do método de fornecimento de dsRNA	36
3.5.3.1	Ingestão oral	36
3.5.3.2	Contato dorsal	37
3.5.3.3	Saturação de dsRNA via contato dorsal	37
3.5.3.4	Método de Translocação de dsRNA em vagem de soja via xilema	37
3.5.4	Deteção do dsRNA GFP via PCR	38
3.5.5	Testes de degradação de dsRNA com nucleases do <i>E.</i> <i>heros</i>	40
3.5.6	Validação dos métodos de fornecimento	40
3.5.6.1	Escolha de genes candidatos para validação do silenciamento	40

3.5.6.2	Método de fornecimento via contato dorsal	41
3.5.6.3	Método de fornecimento por translocação de dsRNA em vagem via xilema	41
3.5.7	Deteccão do silenciamento gênico	42
3.6	Resultados e Discussão	43
3.6.1	Padronização das Metodologias de fornecimento de dsRNA	43
3.6.1.1	Ensaio de fornecimento de dsRNA-GFP: oral e contato	43
3.6.1.2	Ensaio de Degradação de dsRNA	44
3.6.1.3	Saturação de dsRNA via contato dorsal	45
3.6.1.4	Ensaio de fornecimento via Translocação em vagem	46
3.6.2.	Validação das metodologias de fornecimento de dsRNA	49
3.6.2.1	Análise da Expressão do gene <i>act-1</i>	49
3.7	Conclusões	54
4	Referências	55

1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda por alimentos, em níveis mundiais, colabora com o complexo produtivo da soja, sendo umas das principais fontes de proteína vegetal, de importância cada vez maior na alimentação animal e humana. No setor agrícola, a mesma obteve crescimento no Brasil, atingindo 35,1 milhões de hectares plantados na safra de 2017/2018 (CONAB, 2018).

Dado a ampla área de cultivo, esta cultura pode sofrer danos causados por diversas pragas, gerando prejuízos significativos em sua produtividade (DEGRANDE; VIVAN, 2012). Dentre estas pragas, destacam-se os percevejos, causando danos preferencialmente aos grãos, diminuindo seu peso e tamanho, reduzindo sua qualidade e valor (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999; CORRÊA-FERREIRA, 1993). E espécie *Euschistus heros* (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Pentatomidae), chamado de percevejo-marrom, é a mais importante atualmente, apresentando danos crescentes à soja (BIANCO; NISHIMURA, 1998; CHOCOROSQUI; PANIZZI, 2004; HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; FERREIRA et al., 2018).

O uso excessivo de inseticidas químicos e o manejo incorreto da aplicação destes produtos acarreta redução da eficiência das moléculas, geralmente empregadas para o controle do percevejo-marrom (SOSA-GÓMES; SILVA, 2010). Assim, medidas de controle devem ser providenciadas e estudadas para evitar infestações de percevejos que venham a causar prejuízos econômicos, bem como um controle mais específico e alternativo ao controle químico. Este tipo de manejo, pode causar maior pressão ao sistema, gerando, em alguns casos, resistência dos percevejos a estas moléculas (OLIVEIRA et al., 2015).

Através da biotecnologia e com o advento da compreensão dos mecanismos de silenciamento gênico pós-transcricional em eucariotos, a metodologia de RNA interferente (RNAi) se tornou promissora em diversos campos de pesquisa. Neste processo, moléculas de RNA dupla fita, seja de origem endógena ou exógena, são capazes de ativar o processo de silenciamento celular, levando a um bloqueio específico da expressão do gene alvo, seja pela degradação do mRNA ou pelo bloqueio da tradução (CARMELL et al., 2002; MEISTER; TULSH, 2004;).

O RNAi tem sido utilizado amplamente em estudo de genômica, para a determinação da função de genes, e para produção de plantas geneticamente modificadas, para tolerar as ações de insetos-praga e de outros parasitas, expressando moléculas dupla fita de RNA, similares a genes essenciais destes patógenos (EAMENS et al. 2008; MAMTA; RAJAM, 2017). Devido a sua elevada eficiência e especificidade, a metodologia pode gerar um novo método de controle para pragas na agricultura, com impacto ambiental reduzido (PRICE; GATEHOUSE, 2008).

Metodologias de administração ectópica de moléculas de dsRNA também exploram o conhecimento da maquinaria de silenciamento, e vem sendo utilizadas em ensaios com diferentes insetos, por diversas formas de administração, que dependem da interação inseto-hospedeiro, natureza do parasitismo, entre outros fatores (GOSH et al., 2018). Tais métodos podem transferir as moléculas de dsRNA em plantas, dietas, através do *soaking* ou microinjeção (FISHILEVICH et al., 2016; GOSH et al., 2017; CASTELLANOS et al., 2018).

Alternativamente, o fornecimento indireto de moléculas de dsRNA similares aos genes dos patógenos, sejam pela aplicação em raízes ou spray em folhas dos hospedeiros, também tem sido reportado. O método é descrito como HIGS (*Host Induced Gene Silencing*), quando envolve a produção de uma planta geneticamente modificada, expressando o dsRNA, ou de SIGS (*Spray-Induced Gene Silencing*), quando o fornecimento é via *spray* direto nas plantas. Em ambos os casos, o processamento das moléculas de dsRNA ocorre na planta hospedeira, e as moléculas de siRNA transferidas aos insetos praga, ocasionam o silenciamento do gene de interesse (HUNTER et al., 2012; LI et al., 2015; GOSH et al., 2018).

Um dos fatores limitantes do uso ectópico de moléculas de dsRNA é a sua instabilidade no meio ambiente, bem como a limitação dos insetos absorverem doses efetivas para a indução do silenciamento, e ainda a ação das moléculas no interior do organismo alvo. Muitos insetos produzem nucleases que podem degradar o dsRNA e interferir na absorção e estabilidade necessária (SHUKLA et al., 2016).

Neste trabalho, diferentes metodologias de entrega (delivery) das moléculas de dsRNA foram testadas por administração oral e contato. A

estabilidade das moléculas de dsRNA e a capacidade de serem transmitidas aos insetos alvos foram avaliadas, assim como a capacidade de induzir silenciamento e interferir na sobrevivência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos econômicos da sojicultura

A Balança Comercial Brasileira, para o Agronegócio, em julho de 2018, registrou um superávit de US\$ 8,46 bilhões, crescimento de 17,5% em relação a julho de 2017. O complexo soja participa com 50,9% nas exportações do agronegócio, sendo o setor com maior participação nesta categoria (MAPA, 2018).

A região brasileira que se destaca com maiores volumes de produção de cereais, leguminosas e oleaginosas é o Centro-Oeste. Na safra de 2016/17, o estado do Mato Grosso foi o maior produtor de soja, com 26,7% do total nacional, seguido pelo Paraná, com 17,2% e Rio Grande do Sul, com 16,4% (CONAB, 2017).

A soja representa a quarta maior área plantada no mundo, sendo a oleaginosa mais cultivada e consumida (LEMES & GAVASSONI, 2015). Sua produção no Brasil (Figura 1), avançou de 95.434,6 milhões de toneladas na safra 2015/2016 para 114.075,3 milhões de toneladas na safra 2016/2017 (CONAB, 2017).

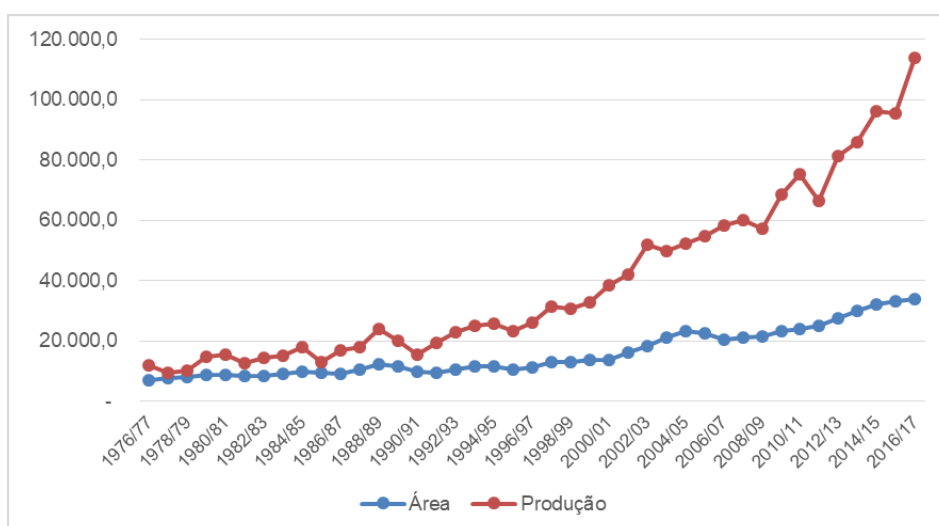


Figura 1. Total de área plantada e produção de soja no Brasil (CONAB, 2017).

No Brasil, a soja representa 46% do total de grãos produzidos. Os Estados com maiores produções de soja são Mato Grosso, Paraná, Rio

Grande do Sul e Goiás, os quais contribuem para mais de 70% do total produzido (CONAB, 2017).

O melhoramento genético e biotecnologia essenciais para o desenvolvimento da soja, tornando-se fatores de diferenciação para a agricultura, com aumento significativo de produção por hectare e adaptabilidade das variedades aos diversos biomas do país, considerado um fator estratégico para a economia e ambiente.

2.2 *Euschistus heros* (Fabricius)

O percevejo-marrom, *Euschistus heros* (Fabricius, 1794) (Heteroptera: Pentatomidae), tem sua origem na Região Neotropical (América Tropical). Atualmente é bem adaptado aos climas quentes, sendo abundante do norte do Paraná ao Centro Oeste do Brasil (HOFFMANN-CAMPO et al. 2000).

As ninfas de 1º instar, após eclosão, permanecem próximas aos ovos, iniciando a alimentação somente no 2º instar, buscando vagens de soja. Tornam-se mais vorazes e danosas no 3º instar, quando iniciam a dispersão. Neste estágio possuem 5 mm de comprimento, e 10 mm no 5º instar. As fêmeas depositam ovos amarelos nas folhas, em massas, contendo em média 5 a 7 ovos, com postura em fileira dupla (Figura 2). O adulto possui ciclo médio de 116 dias (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999).

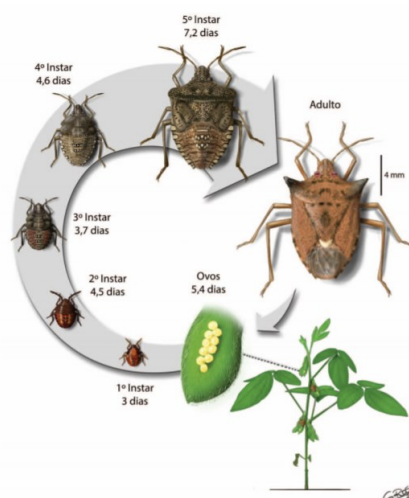


Figura 2. Ciclo do desenvolvimento do percevejo-marrom (CIVIDANES, 1992).

No outono, o percevejo-marrom procura por abrigos, onde pode permanecer até o próximo verão. Neste período, acumula lipídios e não se alimenta, permanecendo em estado de hibernação parcial (PANIZZI; VIVAN, 1997). Nesta situação, podem ficar cerca de sete meses do ano sob palhadas, no solo do entorno de lavouras de soja (PANIZZI; SILVA, 2009).

Essa espécie é avaliada como uma das principais e abundantes pragas da soja no Brasil, tanto em regiões quentes, do norte do Paraná ao Centro-Oeste brasileiro (CORRÊA-FERREIRA et al., 2010), quanto em localidades onde sua presença era considerada rara, como no Estado do Rio Grande do Sul (SALVADORI et al., 2007). Em 1992, foi registrado em áreas de soja na região norte do Paraná (PANIZZI; NIVA, 1994).

Os percevejos possuem o hábito de colonizar e ovipositar nas plantas, em qualquer estágio, mas sua capacidade de causar danos econômicos está condicionada ao período reprodutivo, com o surgimento das primeiras vagens e conseqüentemente os grãos. O percevejo marrom é encontrado com maior frequência na fase vegetativa da soja, devido às altas populações no ambiente da lavoura, com maior incidência de plantas hospedeiras alternativas e o manejo incorreto de inseticidas, que causa desequilíbrios (CORRÊA-FERREIRA et al., 2010c).

De acordo com Degrande e Vivian (2012), as perdas podem ser relevantes e este fato deve-se à formação de vagens chochas, podendo tornar-se secas e nos grãos podem ocorrer deformações, murchamentos e manchas. Quando o ataque ocorre nos grãos já formados (Figura 3), acarretam danos em sua qualidade.



Figura 3. Sementes de soja, com problemas de lesões de danos de percevejo identificados pelo teste de tetrazólio, submetidas ao período de pré-condicionamento de 6 horas/41°C. Londrina, PR, 2007 (Costa et al, 2007).

Os ovos são colocados entre as folhas e nas vagens, com eclosão das ninfas, em média, de 3 a 7 dias. Estas, ao atingirem o 3º ínstar,

começam a dispersar e se alimentar da soja, causando injúrias e danos. O ciclo biológico completa-se entre 32 e 38.6 dias, considerando temperaturas favoráveis (25°C) (HOFFMANN-CAMPO et al, 2000; SILVA et al., 2006).

No município de Londrina-PR, foram registrados, nas safras 2006/2007 e 2007/2008 87% e 84% respectivamente de percevejo marrom, do total de percevejos coletados (CORRÊA-FERREIRA et al., 2010b). Nestas safras, na região de Santa Maria - RS, foi registrado um acréscimo de 3,9% para 11,9% na população desta espécie (KUSS-ROGGIA, 2009).

2.3 Controle de insetos-praga

A agricultura moderna utiliza-se de práticas intensivas de produção, comumente sem preocupações com o manejo sustentável (PATERNIANI, 2001).

O uso de agrotóxicos é a forma mais empregada no controle de pragas de diversas culturas agrícolas. Na maioria das vezes, as aplicações de inseticidas são realizadas de forma inadequada, seja através de aplicações preventivas, utilizadas com muita frequência nas lavouras de soja, ou trabalhando com operações calendarizadas. Em muitos casos, alguns procedimentos como o aproveitamento de operações, visando otimizar o tempo e as máquinas, aliado às aplicações frequentes de produtos de amplo espectro de ação, sobretudo na fase inicial do desenvolvimento da soja, e o não uso das amostragens de pragas com o método de batida de pano, tem levado a um grande desequilíbrio nas lavouras de soja, acarretando sérios problemas (CORRÊA-FERREIRA et al., 2009; CORRÊA-FERREIRA et al., 2010).

Inseticidas químicos são comumente de alta toxicidade e de amplo espectro de ação, com consequências graves ao homem e ao ambiente, além de promover populações de insetos resistentes (PRAÇA et al., 2004).

No período reprodutivo da soja, o percevejo-marrom é a principal praga. Seu pico populacional ocorre nos meses de novembro a abril. Na primavera, o término da diapausa coincide com o final do estágio vegetativo e início da formação de grãos. Isto proporciona uma rápida colonização das plantas de soja, permitindo até três gerações/safra (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999).

Devido aos fatores biológicos de desenvolvimento, falhas de controle são comuns, o que conduz a utilização do mesmo inseticida repetidamente, durante a mesma safra, e com doses crescentes, culminado em resultados indesejáveis, proporcionando a seleção de populações resistentes (SOSA-GÓMES; SILVA, 2010). Adicionalmente, o aumento da população de percevejos, antes do período reprodutivo, faz com que as decisões sejam tomadas preventivamente (RIBEIRO et al, 2016).

Sosa-Gómes e Silva (2010) identificaram populações de percevejo-marrom resistentes a metamidofós no Paraná. No ano 2000, em São Paulo também foram registradas populações do mesmo inseto em soja, com resistência ao mesmo produto, possivelmente como resultado do uso sequencial do mesmo princípio ativo, em doses crescentes (SOSA-GÓMES et al., 2001).

Os problemas de manejo fitossanitário são abrangentes entre as culturas. Martinelli e Omoto (2006) identificaram, na cultura do algodão, quatro espécies de lepidópteros praga, que já expressam ou tem potencial a desenvolverem populações resistentes aos produtos utilizados para o seu controle. Sabe-se que o incremento de populações resistentes de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas é, comumente, devido ao cultivo da segunda safra de milho. Este fato proporciona a intensificação do controle de pragas, resultando na menor eficiência dos produtos tradicionalmente empregados para este fim (DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001).

O controle biológico consiste em estratégias para a proteção e equilíbrio do número de vegetais e animais por seus inimigos naturais, que através do uso racional de patógenos, predadores e parasitoides, visa à manutenção da população de pragas a níveis abaixo dos níveis de dano econômico (ALVES, 1998).

Países produtores de soja têm destinado investimentos tecnológicos no combate às pragas chave, e o Brasil, desde a década de 70, também está em fase de desenvolvimento e aprimoramento de programas, visando a qualidade e produtividade desta cultura. Destaca-se entre estes programas, o Baculovirus anticarsia (AgMNPV) para controle da lagarta da soja, por vírus da poliedrose nuclear multicapsídeo. Este controle é altamente

específico e eficiente aos mecanismos de defesa da lagarta, tornando-se um agente de controle biológico de excelência (MOSCARDI, 1998).

O Brasil realiza o maior programa mundial de uso de baculovírus para o controle de insetos-praga, desde o início da década de 1980, pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), através da utilização do *Baculovirus anticarsia*, para o controle da lagarta da soja (MOSCARDI, 1998; RIBEIRO; PINEDO, 2001; KUSS et al., 2016).

Desta forma, é necessário incrementar e fomentar os programas de manejo integrado de pragas (MIP), para que se difunda o uso de controle biológico de pragas e de novos métodos, como silenciamento gênico, sendo mais seletivos, e com menor impacto ao agroecossistema, proporcionando reduções de aquisição de mecanismos de resistência. Isto se justifica pelo fato de que inúmeras espécies de artrópodes benéficos atuam como agentes de controle biológico, ressaltando o importante papel destes inimigos naturais nos agroecossistemas, tanto no aspecto econômico como no ecológico (FRAGOSO et al., 2001).

Para percevejos-praga, o controle biológico possui poucas opções e a alta capacidade de resistência às moléculas químicas nestas espécies instigam a busca por soluções eficientes e práticas para um controle efetivo à campo, preservando agentes benéficos e o meio ambiente.

2.4 RNA Interferente

O RNA interferente se trata de uma metodologia que explora o mecanismo natural e biológico, que acontece em células eucarióticas a nível pós-transcricional, eliminando a expressão de genes alvos (CARTHEW; SONTHEIWER, 2009). Neste nível, o silenciamento de genes pode ocorrer tanto pela degradação do mRNA, quanto pelo bloqueio de sua tradução (OBBARD et al., 2009), reduzindo ou inativando a atividade do gene de interesse de forma específica.

As primeiras visualizações da ocorrência do processo de silenciamento gênico, ocorreram na tentativa de melhorar as cores de flores púrpuras, onde múltiplas cópias de genes responsáveis pela pigmentação foram inseridas em flores de petúnia e, como resultado, obtiveram-se flores

mescladas ou inteiramente brancas; este processo foi denominado na época, de co-supressão (NAPOLI et al., 1990; KROL et al., 1990).

No estudo com o nematoide *Caenorhabditis elegans*, Fire et al. (1998) descobriram que o silenciamento manifestava-se através da presença de um dsRNA (double-stranded RNA) e nomeou este mecanismo como RNA interferente (RNAi). Nesse estudo, concluiu-se que os efeitos dos RNAi puderam ser observados em células distantes e também em seus descendentes, validando a presença de um mecanismo de transporte nas células. A descoberta foi premiada em 2006 com o prêmio Nobel de Fisiologia aos pesquisadores. Apesar da técnica inovadora para animais, naquela época, a mesma já estava descrita como silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) em plantas e como “quelling” em fungos (FAGARD et al., 2000).

Inicialmente, pensava-se que este silenciamento através de RNAi era somente utilizado como forma de defesa à infecções virais. Após, observou-se que essa maquinaria participa integralmente na regulação da expressão gênica (LILLEY et al., 2007).

Com a presença do dsRNA (RNA de fita dupla) no citoplasma, estes são identificados por endonucleases do tipo RNase III, chamadas DICER, que exercem função catalítica e de ligação ao dsRNA. Deste modo, são clivados em fragmentos pequenos de 21-24 nucleotídeos, nomeados siRNAs (small interfering RNA) (Figura 4) (MEISTER; TULSCH, 2004). O siRNAs possuem fitas separadas por uma helicase e, apenas a fita antisenso é incorporada ao complexo proteico RISC (RNA Induced Silencing Complex), onde existem proteínas de ligação ao RNAm, chamadas de Argonautas, que possuem características de nucleases (CARMELL et al., 2002). Sua função é utilizar esta sequência presente no siRNA como guia, degradando ou bloqueando a tradução do mRNA presente no citoplasma, complementar ao siRNA através de uma endorribonuclease presente no complexo (BARBOSA; LIN, 2004; MARTINEZ et al., 2002).

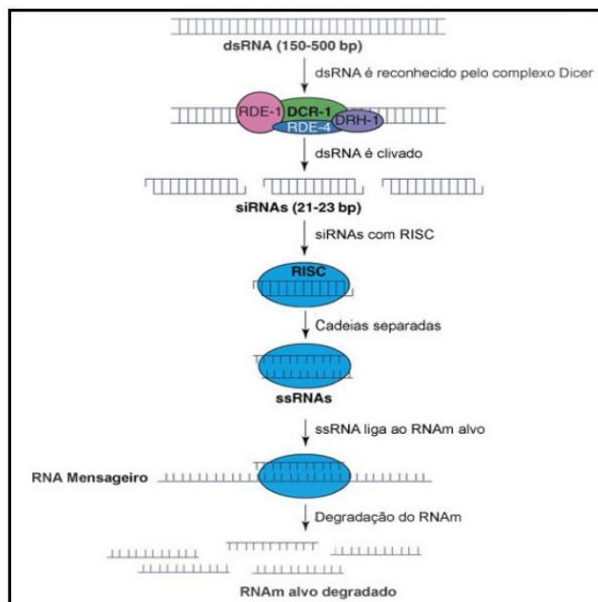


Figura 4. Via de geração de siRNAs e silenciamento gênico em *Caenorhabditis elegans* (ROSSO; JONES; ABAD, 2009).

A técnica de RNAi possui alta eficácia em alguns organismos, sendo que mesmo baixas doses de dsRNA induzem a produção de siRNAs secundárias, onde uma enzima “RNA polimerase RNA-dependente” (RdRP) pode amplificar o processo de silenciamento (Figura 5), através da disseminação destes pequenos RNAs secundários, com a geração de novas moléculas de dsRNA específicos (SIJEN et al., 2001; WATSON et al. 2015).

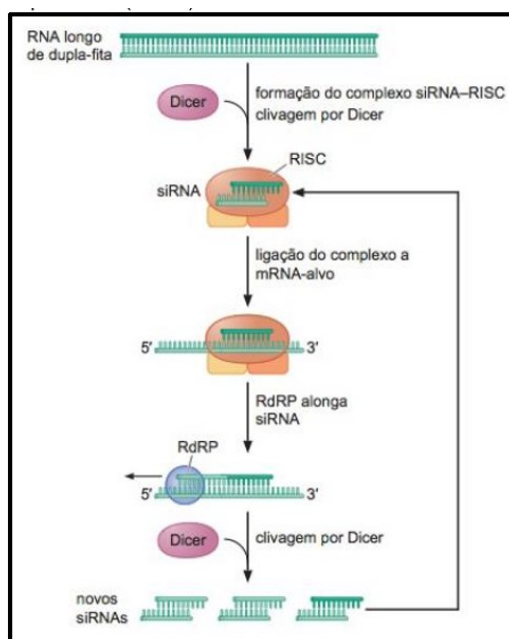


Figura 5. Amplificação do sinal de siRNA pela enzima RNA-polimerase RNA-dependente (RdRP) (WATSON et al., 2015).

O mecanismo de silenciamento pode ser induzido em uma determinada célula e ser transmitido para células vizinhas, possuindo atividade sistêmica e, em alguns organismos, pode ser transmitido através de células germinativas, gerando caráter de herdabilidade (GRISHOK et al., 2000; WINSTON et al., 2007).

O RNAi é relativamente contextualizado como de fácil execução e revolucionou a genômica, sendo utilizado em larga escala, sendo aplicado também em indivíduos de manipulação genética mais dificultada, como no caso dos mamíferos. Em organismos modelo, como *C. elegans* e *Drosophila spp.*, o método tem sido empregado para o estudo a nível global em seus genomas e até mesmo em organismos com técnicas pouco desenvolvidas, como mosquitos e planárias (PERRIMOM et al., 2010; BOUTROS; AHRINGER, 2008).

Vários métodos são aplicados ao silenciamento gênico e a utilização do RNAi vem ampliando seu uso e desenvolvimento quanto à entrega de dsRNA (KOCH; KOGEL, 2014). Dentre elas inclui-se a via de alimentação com dsRNA purificado (BAUM et al., 2007), plantas transgênicas expressando dsRNA (WILL; VILCINSKAS, 2013) e pulverização de dsRNA sintético em plantas (HUNTER et al., 2012; SAN MIGUEL; SCOTT, 2015; LI et al., 2015).

Hunter et al. (2012) e Li et al. (2015) comprovaram a metodologia conhecida como aplicação ectópica de dsRNA, demonstrando que insetos são capazes de absorver estas moléculas de dsRNA, de interesse específico, indiretamente, se alimentando de plantas que foram administradas com tais moléculas via radicular, validando sua translocação pelos tecidos vegetais. Este processo gera uma técnica menos onerosa, comparando-se com *soaking*, a imersão do inseto em solução, e com a produção de um organismo transgênico.

O método onde o silenciamento gênico é induzido pelo hospedeiro, HIGS (*host induced gene silencing*), com uma planta modificada que expressa o dsRNA, foi fundamental para demonstrar que essa estratégia seria promissora na proteção de plantas. Neste sentido, é mais eficaz, tanto pela alta seletividade para o alvo, como pelos reduzidos danos ao ambiente, se comparado com o controle químico (KOCH; KOGEL, 2014). Neste caso, os

dsRNAs produzidos pela planta geneticamente modificada, são processados pela maquinaria RNAi do hospedeiro, gerando pequenos RNAs de interferência (siRNA), que são então ingeridos, através da alimentação do inseto, incorporados no complexo RISC, ativando o silenciamento (LOURENÇO, 2014).

2.5 RNA interferente para o controle de pragas

O uso da técnica de silenciamento, através de RNAi, está crescendo no aspecto de funcionalidade e descobertas para a biologia molecular e na entomologia. A utilização deste mecanismo, em insetos modelos, como *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum* e *Bombyx mori* permitiu determinar funções da proteína DICER e do complexo RISC (HAMMOND et al., 2000; LIU et al., 2003).

A metodologia vem sendo empregada seja pela entrega das moléculas em dietas, microinjeção direta no inseto, produção de plantas geneticamente modificadas expressando tais moléculas de dsRNA ou mesmo sua pulverização em órgãos específicos na planta alvo.

O meio de fornecimento de dsRNA para os insetos pode influenciar expressivamente no resultado da técnica, sendo que para um silenciamento gênico eficaz, a molécula efetora tem que estar presente dentro das células do organismo alvo. Este é o fator mais limitante para a ação efetora deste mecanismo, pois a absorção deste RNA nas células-alvo é obrigatória para o sucesso, podendo catalisar a disseminação pelo organismo (HUVENNE; SMAGHE, 2010).

O silenciamento gênico, via RNAi, para o controle de pragas, foi primeiramente publicado por Baum et al. (2007) e Mao et al. (2007), sendo que os primeiros autores testaram a ingestão de dsRNA similares a uma gama de genes, assim como diferentes concentrações em larvas de *Diabrotica virgifera*, coleóptero praga do milho, resultando em 125 genes com retardo do crescimento ou mortalidade.

Posteriormente, Mao et. Al (2007) utilizaram como alvo para o RNAi, um gene que confere resistência ao terpenóide gossipol, produzindo plantas geneticamente modificadas expressando pequenos RNAs similares à

proteína P450 monooxigenada presente no inseto, capaz de inativar o terpenoide produzido pela planta. Foram utilizadas lagartas de *Helicoverpa armigera* que possuem este gene específico, concedendo tolerância ao gossipol. As mesmas foram alimentadas com as plantas de tabaco e *Arabidopsis* geneticamente modificadas, expressando o dsRNA deste gene específico, resultando numa redução significativa da expressão da monooxigenase. Quando essas lagartas foram alimentadas com dieta contendo o dsRNA e gossipol, as mesmas tiveram retardo significativo no crescimento.

Vários trabalhos posteriores via produção de plantas GM expressando moléculas de dsRNA similares a genes de insetos foram testadas. Plantas modificadas de tabaco, expressando siRNA para silenciar gene da mosca branca, similar a uma das subunidades da ATPase A, levaram a redução em até 62% deste transcrito, após a alimentação destes insetos. Observou-se que 10 a 15% da população inicial sobreviveu na linhagem da planta geneticamente modificada, enquanto nas plantas de tabaco controle, o nível de infestação permaneceu alto, gerando uma perda significativa do teor de açúcar, levando à queda de folhas, consequência não observada nas plantas modificadas (THAKUR et al., 2014).

Já Abdellatef et al. (2015) estudaram pulgões que foram alimentados com cevada GM, expressando uma dsRNA para o gene que expressa a enzima shn. Este gene forma a bainha que envolve o estilete e auxilia na sucção da seiva, obtendo níveis de produção significativamente menores de mRNA, comparado à pulgões se alimentando de plantas controle. Tais resultados foram confirmados por análises microscópicas, visualizando a ampla redução da formação de bainhas. Conseqüentemente, a expressão de shp permaneceu significativamente reduzida nas seis gerações posteriores, mesmo se alimentando de plantas controle.

A microinjeção no trato digestório é um dos métodos utilizados para validar o silenciamento e detectar o complexo RISC no inseto, como por exemplo, em *Spodoptera exigua* (CHEN et al., 2008) e em *Phyllotreta striolata* (ZHAO et al., 2011);

Estudos de injeção de dsRNA exógeno, em *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), são utilizados para identificar a ação sistêmica do silenciamento e sua estabilidade em larvas (TOMOYASU;

DENELL, 2004) e a viabilização dos genes responsáveis pelo desenvolvimento deste besouro (MARQUES-SOUZA et al., 2008).

O método também foi utilizado para o percevejo-marrom, obtendo informações de mortalidade, estabilidade e testes de genes específicos para silenciamento, onde foi injetado em ninfas de 2º ínstar, altas doses de solução de dsRNA de dois genes essenciais para o percevejo-marrom (*act-1* e *act-2*) obtendo 100% de mortalidade. Com a dose diluída em 1.000 vezes (27,6 ng/g do percevejo) a mortalidade foi de 80% ambos em três dias (FISHILEVICH et al., 2016).

Em estudo do potencial de mortalidade através de administração de dsRNA para silenciamento gênico, CASTELLANOS et al. (2018) observaram mortalidade de 95%, microinjetando 27,5 ng de dsRNA similar ao gene de actina muscular *act-2* em *Euschistus heros*.

A administração de moléculas de dsRNA via alimentar, também foi testada em *Spodoptera exigua* (TIAN et al., 2009), *Nilaparvata lugens* (CHEN et al., 2010), *Bactrocera dorsalis* (LI et al., 2011), *Leptinotarsa decemlineata* (ZHU et al., 2011), *Phyllotreta striolata* (ZHAO et al., 2008) e *Bemisia tabaci* (UPADHYAY et al., 2011) neste caso, se tratando de inseto sugador, utilizou 20 µg/mL em dieta artificial para alimentar adultos, obtendo mortalidade de 13,33% com o gene Actin e 97,50% com V-ATPase A, ambos em 6 dias.

Através de estudos de absorção por via oral, foi detectado forte degradação por nucleases na saliva e sistema digestivo do percevejo-marrom. Por este motivo, foram utilizados Lipossoma (Lipofectamine 2000) e 3% de EDTA, atuando como protetores para molécula de dsRNA, com o objetivo de aumentar a estabilidade e conservação destas moléculas via alimentação (CASTELLANOS et al., 2018). Neste estudo, foi utilizada dieta artificial com 320 ng/µL utilizando dsRNA dos genes *act-2* e *vATPase A* onde foi observado em 14 dias, 33% de mortalidade com *dsact-2* e 30% com *dsvATPase A*. Já com a utilização do protetor Lipossoma, obteve um acréscimo na mortalidade em 14 dias para 42% com *dsact-2* e 45% com *dsvATPase A*.

O uso do método de aplicação ectópica via pulverização e contato, para a tecnologia de RNAi no controle de pragas, é uma opção para contornar o custo, exigências burocráticas, de biossegurança e limitações da

técnica de transformação genética, existente para várias espécies de plantas. Entretanto, no caso da absorção via oral em alguns insetos Hemipteros é relativamente baixa, devido a existência de proteínas, ribonuclease na saliva, capazes de degradar o dsRNA antes da infecção, prejudicando a resposta de RNAi. Algumas alternativas são empregadas para aumentar a estabilidade e captação celular vem sendo empregadas, como o uso de altas doses de dsRNA (GOSH et al., 2018), lipossomos catiônicos ou EDTA, que atuam como inibidor de proteínas das nucleases na saliva (ZHANG et al., 2010; BARRA et al., 2015).

O uso de inseticidas moleculares para o controle de insetos praga, utilizando estratégias de RNA de interferência, estão em teste (SAN MIGUEL; SCOTT, 2016). Estratégias via RNAi, com aplicação direta, sem o uso da modificação em plantas, foi reconhecida pela CTNBio, como estratégia livre de transgenia, concebendo numa opção para uso comercial relevante, solucionando os questionamentos sobre segurança, associados aos OGMs.

Plantas modificadas foram lançadas em 2017, para uso prático na agricultura, como o recente caso do milho transgênico SmartStax Pro®, que expressa dsRNA do gene *Snf7*, proteína vacuolar essencial, que atua no transporte de nutrientes no interior das células. O mesmo foi lançado no mercado norte-americano pela empresa Monsanto. Esta modificação gera resistência através do RNAi às larvas do besouro *Diabrotica virgifera virgifera*, que causam danos a raiz do milho, gerando perdas na produtividade. Esse foi o primeiro lançamento de planta resistente comercial, que utiliza a técnica de RNAi, para o controle de uma praga agrícola (ZHANG et al., 2017).

3 ARTIGO: MÉTODO PARA EMPREGO DE dsRNA VISANDO CONTROLE E ESTUDOS FUNCIONAIS VIA SILENCIAMENTO GÊNICO EM PERCEVEJO-MARROM

3.1 Resumo

A cultura da soja possui lugar de destaque entre os produtos agricultáveis brasileiros. Ataques de pragas podem diminuir sua qualidade e produção, sendo o percevejo-marrom, *Euschistus heros*, considerado uma das principais pragas da cultura, gerando prejuízos significativos na produtividade e qualidade dos grãos. O processo de silenciamento gênico pós-transcricional, metodologia conhecida como RNA interferente (RNAi), tem se mostrado uma alternativa eficiente e seletiva para o controle de pragas via silenciamento de genes essenciais. Este trabalho teve como objetivo estabelecer um método de fornecimento de moléculas de dsRNA para indução da maquinaria de silenciamento gênico em *E. heros*, visando o controle e estudos funcionais no percevejo-marrom. Foram testados inicialmente 3 métodos de fornecimento: via contato dorsal, via alimentar e por translocação em vagens, todos utilizando inicialmente a dose de 10ug/50µL. Nesta dose, a detecção das moléculas de dsRNA-GFP ocorreu somente em alguns percevejos alimentados de vagens translocadas. Nos ensaios de translocação, nesta dose as moléculas de dsRNA foram detectadas apenas nos terços proximais ao pedúnculo e não foi detectada nas sementes. Ensaios de saturação permitiram a detecção das moléculas de dsRNA apenas a partir da dose de 50ug/50µL quando aplicadas diretamente no dorso do inseto. Moléculas de dsRNA similares a este gene de actina citoplasmática, foram sintetizadas e administradas via translocação pelo xilema das vagens, que foram então fornecidas via alimentar aos percevejos. A capacidade de absorção nas vagens e sua transferência para os insetos foi testada na dose 50µg/300µL, sendo possível detectar a presença do dsRNA em toda a vagem, por conseguinte, detectado no percevejo. Após o estabelecimento do método, este foi validado pela confirmação dos níveis de silenciamento gênico do gene *act-1* para expressar o silenciamento através da absorção de dsRNA *act-1* onde, por via contato, obtendo 30% de silenciamento em 24 horas e via alimentação com vagens de soja translocadas gerando 50% de mortalidade com *dsact-1* e com adição de protetor EDTA, obteve-se 65% de mortalidade ambos em 96 horas. Contudo, estes métodos são eficientes para estudos funcionais, sendo o de contato através de solução com dsRNA, considerado mais prático, sendo o de mais rápida reação. O método de alimentação em vagem de soja foi eficaz, gerando alta mortalidade aos percevejos.

Palavras-chave: *Euschistus heros*, controle de pragas, RNA interferente, seletividade, pragas da soja.

3.2 Abstract

The soybean crop has a prominent place among Brazilian agricultural products. Pest attacks can diminish their quality and production, being the Neotropical Brown Stink Bug (NBSB), *Euschistus heros*, considered one of the main pests of the crop, generating significant damages in the productivity and quality of the grains. The post-transcriptional gene silencing process, a methodology known as interfering RNA (RNAi), has been shown to be an efficient and selective alternative for pest control via silencing of essential genes. This work aimed to establish a method of supplying dsRNA molecules for the induction of the gene silencing machinery in *E. heros*, aiming at the control and functional studies in the NBSB. Three methods of delivery were initially tested: via dorsal contact, food route and translocation in pods, all initially using the 10ug/50µL dose. At this dose, the detection of dsRNA-GFP molecules occurred only in some bedbugs fed translocated pods. In the translocation assays, at this dose the dsRNA molecules were only detected in the proximal thirds to the peduncle and it was not detected in the seeds. Saturation assays allowed the detection of dsRNA molecules only from the 50ug/50µL dose when applied directly to the insect back. Translocation assays via dsRNA continuous flow confirmed the translocation capacity for seeds and insects, and this method was validated using the act-1 gene. dsRNA molecules similar to this cytoplasmic actin gene were synthesized and administered via xylem translocation of the pods, which were then fed via the bed bugs. dsRNA molecules similar to the GFP protein were administered via alimentary, using translocated pods and through contact with solution containing the dsRNA, for the insects. The absorption capacity in the pods and their transfer to the insects was tested at 50µg / 300µL dose, being possible to detect the presence of dsRNA throughout the pod, therefore, detected in the bed bug. After the establishment of the method, this was validated by the confirmation of the gene silencing levels of the act-1 gene to express the silencing through the absorption of dsRNA act-1 where through these two methods, via contact obtaining 30% of silencing in 24 hours and via feeding with translocated soybeans yielding 50% mortality with dsact-1 and with EDTA addition, 65% mortality was achieved both in 96 hours. However, these methods are efficient for functional studies, being that of contact through solution with dsRNA, considered more practical, being the one of more rapid reaction.

Key words: control of pests, RNA interference, selectivity, soybean pests.

3.3 Introdução

A soja se destaca no Brasil, por sua área plantada, produtividade e elevada participação na balança comercial. Em 2017, o agronegócio representou 23,5% do PIB nacional (CEPEA, 2018), tendo a mesma, forte representatividade. Na safra de 2016/17, a receita obtida nas exportações de todo complexo soja foi de aproximadamente US\$ 31,6 bilhões, sendo que a participação de todo o agronegócio foi de US\$ 96 bilhões (MAPA, 2018).

Referente às pragas da soja, destaca-se o percevejo-marrom *Euschistus heros* (Fabricius), inseto causador de danos, preferencialmente aos grãos (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; PANIZZI et al., 2013). Ele é nativo da Região Neotropical, ocorrendo na América do Sul (PANIZZI, 2004). A primeira ocorrência em soja no Brasil, foi registrada por Williams et al. (1973), no Estado de São Paulo. Entretanto, é uma das principais e abundantes pragas da soja no Brasil, tanto em regiões quentes, do norte do Paraná ao Centro-Oeste brasileiro (CORRÊA-FERREIRA et al., 2010), quanto em regiões onde sua presença era considerada rara, como no Rio Grande do Sul (SALVADORI et al., 2007).

De acordo com Depieri (2010), quando o ataque dos percevejos acontece no período de formação de vagens e enchimento de grãos, as perdas podem alcançar 30%, causando a formação de vagens chochas, malformadas, podendo chegar à vagem seca. Nos grãos podem ocorrer deformações, manchas. Quando o ataque ocorre em grãos já formados, existe danos na qualidade e vigor das sementes.

Medidas de controle devem ser desenvolvidas para evitar infestações de percevejos que venham a causar prejuízos, bem como um controle mais específico e alternativo ao controle químico, qual vem sendo utilizado indiscriminadamente, podendo causar maior pressão ao sistema, gerando, em alguns casos, resistência dos percevejos às moléculas existentes (OLIVEIRA et al., 2015).

Os benefícios de práticas integradas e mais sustentáveis para o controle de insetos-praga da soja, como exemplo, o controle biológico e o RNA interferente (RNAi), vem sendo estudadas para utilização em campo e

aumento da eficiência e estabilidade de populações. Tais ações mantem a biodiversidade, pela manutenção de agentes benéficos como predadores, parasitoides e diminuindo surtos de pragas (PANIZZI, 2013; TUELHER et al., 2018).

O RNAi explora o mecanismo celular de silenciamento gênico, que ocorre naturalmente em vários organismos eucarióticos, sendo usado com alta eficácia, possuindo grande potencial como controle de pragas (PRICE; GATEHOUSE, 2008). Trata-se de um processo que causa o silenciamento de genes, antes de sua tradução, pela degradação do mRNA ou bloqueio da tradução (OBBARD, et al., 2009). Este processo primeiramente foi descrito em plantas e nomeado como silenciamento gênico pós-transcricional, ou PTGS (JORGENSEN, et al., 1996).

Dentre as possibilidades de indução de silenciamento gênico, via RNAi destacam-se o emprego de plantas geneticamente modificadas (GM) expressando moléculas de dupla fita de RNA (dsRNA) ou aberrantes similares aos genes do inseto, ou a aplicação direta de moléculas de dsRNA sintéticas. Neste caso o dsRNA pode ser administrado através de microinjeção, imersão na solução (contato) ou ingestão em dietas (oral).

Todas estas metodologias vêm sendo amplamente testadas em diferentes tipos de insetos. Plantas geneticamente modificadas como tabaco, *Arabidopsis* (MAO et al., 2007), cevada (ABDELLATEF et al., 2015) e milho (ZHANG et al., 2017) inclusive aprovadas para uso comercial.

A microinjeção constitui o método mais eficaz para estudos funcionais e determinação da existência de uma maquinaria de silenciamento ativa, no entanto apresenta limitações quanto ao seu emprego como alternativa de controle. Diferentes estudos (SCOTT, et al., 2013; CHRISTIAENS; SMAGGHE, 2014) demonstrando o efeito de doses e a ocorrência de uma maquinaria ativa foram publicados para percevejo *Halyomorpha halys* (GOSH et al., 2018) e *Euschistus heros* (FISHILEVICH et al., 2016; CASTELLANOS et al., 2018) validando a funcionalidade deste método na ativação da maquinaria de silenciamento em espécies da família Pentatomidae.

A administração de moléculas de dsRNA via oral, pela sua adição em dietas, também foi descrita em diferentes espécies de insetos, inclusive em *E. heros*, no entanto, devido a ocorrência de nucleases presentes

na saliva e sistema digestivo (ZHANG et al., 2010; BARRA et al., 2015), elevadas doses necessitam ser administradas (GOSH et al., 2018). Adicionalmente, o emprego de moléculas protetoras de dsRNA, como o encapsulamento com polissomos, o uso de agentes quelantes (EDTA) (CASTELLANOS et al., 2018) ou o desenvolvimento de estruturas alternativas da molécula de dsRNA tem provido melhor estabilidade, e mortalidade neste percevejo.

Considerando que o ataque do percevejo-marrom, no estágio reprodutivo da soja, causa danos econômicos significativos à qualidade e produção e a baixa opção de controle efetivo de menor agressão ambiental, torna-se relevante o estudo e desenvolvimento de controle populacional desta praga através da técnica de RNAi, definindo um método eficiente e menos oneroso para controle através do silenciamento de genes alvo desta praga.

Até o momento, nenhum método de entrega de dsRNA foi demonstrado em *E. heros* via fornecimento direto em vagens de soja (*Glycine max*) ou contato direto, visando uma forma mais natural de administração. Neste trabalho, as diferentes metodologias de administração de dsRNA, via oral, pelo fornecimento de vagens onde o dsRNA foi translocado via pecíolo, e contato, foram avaliadas quanto a estabilidade e capacidade de transferência para os insetos alvo.

A metodologia de administração foi validada com o emprego de moléculas de dsRNA similares ao gene *act-1*, envolvido na atividade muscular (FISCHILEVICH et al., 2016). Ambos os métodos testados levaram a redução na taxa de mortalidade de *E. heros*, sendo que elevados níveis de mortalidade foram observados quando um agente quelante foi administrado conjuntamente, demonstrando potencial promissor do emprego de RNAi para percevejo marrom.

3.4 Objetivo

Estabelecer um método de indução de silenciamento gênico através da técnica de RNAi para o percevejo-marrom pelo emprego de moléculas de dsRNA.

3.4.1 Objetivos específicos

Identificar a melhor alternativa para fornecimento de moléculas de dsRNA para *E. heros*: via alimentar ou contato direto.

Determinar a estabilidade e translocação de moléculas de dsRNA em vagens de soja.

Determinar a ingestão e estabilidade de moléculas de dsRNA para *E. heros*.

Selecionar um gene essencial de *E. heros* para avaliar efeitos de silenciamento gênico através de RNAi.

Determinar os níveis de silenciamento a partir do método selecionado com base na quantificação dos níveis de um mRNA do gene alvo identificado.

Determinar os níveis de mortalidade a partir de um método selecionado.

3.5 Material e Métodos

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Biotecnologia Vegetal e Entomologia da Embrapa soja, em Londrina, Paraná, nos anos de 2017 e 2018.

3.5.1 Obtenção do percevejo *Euschistus heros*

Os percevejos foram adquiridos da criação da Embrapa Soja, quais são criados e mantidos em câmaras BOD, à 26°C ±2, alimentados com dieta de ligustro (*Ligustrum lucidum*), vagens de feijão, sementes de girassol e soja.

3.5.2 Determinação do tempo de restrição alimentar

Para os experimentos de ingestão de dsRNA-GFP, os percevejos adultos foram padronizados, deixados em jejum hídrico e alimentar por 24h em BOD à temperatura de 26°C ±2.

Foi realizado um bioensaio de capacidade de restrição hídrica e alimentar visando definir a mortalidade referente à capacidade de jejum no qual três tempos foram considerados (48, 72 e 96 horas), com 30 percevejos no total.

3.5.3 Padronização do método de fornecimento de dsRNA

Todos os ensaios de padronização do método de fornecimento de dsRNA foram conduzidos com moléculas de dsRNA similares ao gene GFP (*green fluorescent protein*), ausente tanto nos genomas da soja como o percevejo. Após a administração das moléculas, o sucesso do método foi verificado pela capacidade de detecção das moléculas de dsRNA nos tecidos da soja e do inseto, via PCR, demonstrando sua capacidade de translocação e estabilidade.

3.5.3.1 Ingestão oral

Inicialmente, para verificar se a solução iria ser atraente ao percevejo, um bioensaio de atração e fornecimento de soluções em algodão foi conduzido para avaliar a atração e consumo. Para isto, foram utilizados percevejos em jejum de 24h e sem jejum. Sete soluções foram administradas (água + 20% NaCl; água + 5% NaCl; água + 1% NaCl; água + 20% sacarose; água + 5% sacarose; água + 1% sacarose; somente água). Foi colocado um percevejo por solução e observado seu comportamento, considerando a quantidade de investidas no algodão umedecido e o tempo com o estilete inserido no algodão. Houve diferença significativa entre as soluções, sendo a solução salina a mais atrativa. No entanto, como foi verificado uma alteração comportamental generalizada, foi optado pela administração apenas com água no decorrer do experimento.

Para o ensaio de ingestão oral, foram selecionados aleatoriamente 10 adultos de percevejo-marrom da criação, deixados sob jejum hídrico e alimentar por 24h. Foram utilizadas 10 placas de Petri de vidro contendo uma lamínula de alimentação em cada placa. Em cada placa foi colocada uma lamínula, contendo solução de 50µl com 10µg de dsRNA-GFP em cada. Posteriormente, foi individualizado um percevejo em cada placa, para absorção da solução via alimentar por 24h. As placas foram mantidas em BOD com fotoperíodo de 14h e temperatura de 26°C ±2. Após 24 horas, os percevejos foram coletados, lavados com água destilada, imediatamente congelados em N líquido e armazenados em ultrafreezer a -80°C. Após, foi realizado extração de RNA total, via Trizol[®].

3.5.3.2 Contato dorsal

Foram selecionados 04 adultos de percevejo-marrom da criação, mantidos em jejum por 24 horas. Foram utilizadas 04 placas de Petri de vidro para acondicionamento dos indivíduos. Foi pipetada a solução de 2µl com 10µg de dsRNA-GFP no dorso de cada percevejo, embaixo da asa. Posteriormente, foram individualizados nas placas de Petri contendo algodão com água e vagens de soja. Foram acondicionados por 24h em BOD, com fotoperíodo de 14h e temperatura de 26°C ±2. Após este período, foram coletados, descartadas as asas, lavados com água destilada, congelados imediatamente em N líquido e armazenados em ultrafreezer a -80°C. Após, foi realizado extração de RNA total, via Trizol[®] *Invitrogen* (protocolo adaptado).

3.5.3.3 Saturação de dsRNA via contato dorsal

Foram selecionados 30 adultos de percevejo-marrom da criação, mantidos em jejum por 24 horas. Posteriormente, foram utilizados 10 percevejos para cada administração de diferentes doses de dsRNA GFP: 50 µg (50.1 a 50.10), 100 µg (100.1 a 100.10) e 200 µg (200.1 a 200.10). Cada quantidade de dsRNA-GFP foi pipetada numa solução de 2µl no dorso de cada percevejo, embaixo da asa. Posteriormente, foram colocados em caixas de acrílico Gerbox, para acondicionamento, mantendo disponibilidade alimentar e hídrica. Neste caso, separados por dose testada e mantidos 24h armazenados em BOD, com fotoperíodo de 14h e temperatura de 26°C ±2. Após este período, foram coletados, descartadas as asas, lavados com água destilada, congelados imediatamente em N líquido e armazenados em ultrafreezer a -80°C. Foi realizado extração de RNA total via Trizol[®], PCR qualitativo com primer específico (F2 R2 de amplicon 206 pb) e eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da absorção do dsRNA GFP.

3.5.3.4 Método de Translocação de dsRNA em vagem de soja via xilema

Para determinar o maior volume possível de solução para absorção via xilema em vagens de soja por 24h, foi realizado bioensaio onde foram testados os volumes de 5µL, 10µL, 15µL, 20µL, 30µL, 50µL e 100µL com

5 repetições cada, onde 50µL foi o volume que em 24h todas as 5 vagens absorveram toda a solução. Este foi o volume utilizado nos experimentos.

Foram coletadas 5 vagens de soja BRS 1003 RR IPRO, em estágio R5.3 padronizadas em tamanho e com 3 sementes com o máximo de pedúnculo possível. Inseriu-se uma microgota de solução de dsRNA GFP de 50µL com 10µg, no fundo de um tubo de 2mL. Após aproximado o pedúnculo da vagem na microgota e deixado por 24h em BOD com fotoperíodo de 14 horas e temperatura de 26°C. Decorridas 24 horas para absorção, foram colocadas em placas de Petri, individualmente e adicionados 4 percevejos *E. heros* adultos, para se alimentarem destas vagens, por mais 24 horas. Após este período, as vagens foram lavadas com água destilada, seccionadas em três segmentos (Figura 6). Foram separadas as vagens das sementes, congeladas em N líquido e armazenado em ultrafreezer, a -80°C. Os percevejos foram lavados com água destilada, congelados em N líquido e armazenados em ultrafreezer a -80°C. Após, foi realizado a extração de RNA total, via protocolo de Trizol *Invitrogen*, PCR e eletroforese, para validação da translocação nas secções e absorção para os percevejos.



Figura 6. Detalhamento das seções avaliadas para translocação de dsRNA.

3.5.4 Detecção do dsRNA GFP via PCR

O RNA total dos percevejos foi extraído utilizando-se do reagente Trizol (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA), com protocolo adaptado. Os

percevejos foram macerados em tubo de 2 mL acrescidos 0,75 mL do reagente Trizol e microbolas de alumínio em shaker master a 1100 rpm. Após foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 20 segundos e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação em 13.500 rpm por 15 minutos à 4°C, foi transferido o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL estéril. O clorofórmio adicionado ao Trizol com RNA solubiliza os lipídios da membrana celular e nucleares. Prosseguiu-se de centrifugação, que separa a solução em fase aquosa e orgânica, permitindo sua extração. Após, foi iniciado a precipitação, com 0,5 mL de isopropanol e incubado por 10 minutos, em temperatura ambiente e realizada nova centrifugação em 13.500 rpm, por 15 minutos, a 4°C, para precipitar o RNA. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 100% e removido, após centrifugação em 13.500 rpm por 8 minutos a 4°C. Foi repetido este processo por mais duas vezes, com etanol 75%. O precipitado final foi diluído em 20 µL de água tratada, com DEPC (dietilpirocarbonato) autoclavada. A concentração de RNA total das amostras foi quantificada em espectrofotômetro (Nanodrop) e a integridade do RNA total dos percevejos verificadas por eletroforese, em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo (EtBr), em tampão SB pH 8,5.

Para confirmar a presença das moléculas de dsRNA, todas as amostras foram amplificadas via PCR qualitativo com primer específico para o dsRNA-GFP, utilizando-se dos primers GFP-F (5'TCAGTGGAGAGGGTGAAGGT-3') e GFP-R (5'GGTCCTCTCCTGCACGTATC-3'), gerando um amplicon de 206 pb.

As reações foram conduzidas com 300ng de RNA total. Para as misturas de reação foram utilizados 1 µL de RNA a [300ng/µL], 17,3 µL de água Milli-Q, 2,5 µL de tampão de PCR [10x], 1 µL de dNTPs Mix a [2,5mM], 1 µL de MgCl₂ a [50mM], 2 µL PCR primer, forward e reverse, a [10µM] e 0,2 µL Taq DNA Polimerase [5U/µL], tendo como volume final de reação 25 µL. As misturas de reação foram incubadas em termociclador para a amplificação dos fragmentos utilizando-se o seguinte programa: 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e um passo adicional de 72°C por 7 minutos. As reações de PCR foram realizadas sempre acompanhadas de reações com controle negativo (branco) e reação positiva com o dsRNA GFP íntegro. Os produtos da

amplificação foram analisados por eletroforese horizontal convencional, sendo aplicado como marcador junto as amostras 5µl de 1 kb plus, utilizado para inferir o tamanho do fragmento obtido na PCR. Os géis de agarose 1 % foram preparados com tampão SB 1X, e corado com brometo de etídio (10 mg/mL). Para a aquisição e armazenamento das imagens, foi utilizado o equipamento transluminador e fotodocumentador Loccus.

3.5.5 Testes de degradação de dsRNA com nucleases do *E. heros*

Para a extração de proteínas totais, foi utilizado um pool de 3 percevejos de 3º ínstar inteiros (NI 3), 3 sistemas digestivo de adultos (SDA) obtidos através de dissecação administração de solução PBS 1X e 3 adultos com hemolinfa (HEA) coletada. As amostras foram acondicionadas em tubo de 2 mL com 100 µL de PBS 1X e maceradas com o auxílio de pistilo até obter homogenato. Após, centrifugado à 8.000 rpm por 7 minutos à 4°C. Foi retirado o sobrenadante (proteínas totais) e descartado o precipitado. Realizou-se uma diluição seriada 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 do extrato proteico, sendo utilizado 10 ul de cada diluição para os testes. À cada 10 uL foi acrescentado 1 µg de dsRNA GFP, sendo a solução incubada em temperatura ambiente por 1,5 horas. A degradação foi avaliada a partir dos perfis das bandas via eletroforese com gel de agarose 1% com tampão SB 1X e brometo de etídio.

3.5.6 Validação dos métodos de fornecimento

A fim de validar os métodos de fornecimento do dsRNA, um gene essencial do inseto foi escolhido para os ensaios, sendo testados os diferentes métodos de fornecimento padronizados anteriormente. O sucesso do método foi determinado pela capacidade de detecção de silenciamento do gene de interesse e seu da medida de seu efeito direto no desenvolvimento dos insetos avaliados pela taxa de mortalidade.

3.5.6.1 Escolha de genes candidatos para validação do silenciamento

Para a validação dos métodos de fornecimento das moléculas de dsRNA, foi conduzida uma busca de genes candidatos contidos em estudos atuais e diretamente ligados ao percevejo-marrom, que fossem encontrados

em bancos públicos. Para os ensaios de silenciamento foi determinado o gene *act-1* (actina citoplasmática) (*GenBank: KT819630.1*) para sintetizar o dsRNA. Para normalizador, foi utilizado primer específico do gene *act-2* (actina muscular) (*GenBank: KT369806.1*) de amplicon 120 pb (F – 5' TCAAGGAAAACTGTGCTATGT 3' e R – 5' TACCGATGGTGATGACCTGA 3') (FISHILEVICH et al., 2016).

3.5.6.2 Método de fornecimento via contato dorsal

Ninfas de 4^o ínstar de percevejo-marrom, mantidos em jejum por 24 horas foram utilizadas para absorção via contato de dsRNA *act-1* com cinco repetições para cada tratamento, onde T1 Controle: água + dsRNA GFP (50µL/50µg) ; T2: água + dsRNA *act-1* (50µL/50µg); T3: água + dsRNA *act-1* + EDTA 0,5mM (50µL/50µg com 3% EDTA). Foi pipetada a solução de 50µL com 50µg de dsRNA no dorso de cada percevejo individualizados em placas de Petri. Foram acondicionados por 24h em BOD, com fotoperíodo de 14h e temperatura de ±26°C. Após este período, foram coletados, lavados com água destilada, congelados imediatamente em N líquido, extraído o RNA Total pelo protocolo de Trizol *Invitrogen* para realização de RT-qPCR para verificar os níveis de expressão e silenciamento.

3.5.6.3 Método de fornecimento por translocação de dsRNA em vagem via xilema

Foram coletadas 27 vagens de soja da variedade BRS 1003 rr IPRO para a translocação de dsRNA via capilaridade sendo utilizada nove vagens para cada tratamento, onde T1 Controle: água + dsRNA GFP (300µL/50µg); T2: água + dsRNA *act-1* (300µL/50µg); T3: água + dsRNA *act-1* + EDTA 0,5mM (300µL/50µg com 3% EDTA). As vagens foram inseridas em tubos de 2mL contendo a solução para absorção e deixadas por 24h em temperatura ambiente. Após decorridas 24h, as vagens foram acondicionadas em caixas de acrílico tipo Gerbox, contendo 3 vagens por caixa e após foram inseridos 2 percevejos de 4^o ínstar em cada caixa para coleta em 24h e 48h de exposição e alimentação nas vagens. Ao final, para cada tratamento, foi coletado 3 repetições de percevejos de cada tempo. Após foram congelados

em N líquido, extraído o RNA Total pelo protocolo de Trizol *Invitrogen* para realização de RT-qPCR para verificar os níveis de silenciamento.

Parte da amostra das vagens e percevejos do tratamento 1 (T1) foram utilizadas para validação da translocação em vagens e sementes bem como detecção do dsRNA-GFP nos percevejos através de sua alimentação.

Uma nova repetição do experimento acima, foi realizado para definição da mortalidade dos percevejos, onde não foram coletados, e sim, observando em 24, 48, 72 e 96 horas e anotados percevejos vivos e mortos.

3.5.7 Detecção do silenciamento gênico

As análises do perfil de expressão do gene *act-1* com o dsRNA sintetizado foram realizadas por RT-qPCR em termociclador 7900 Real Time System (Applied Biosystem), utilizando o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Invitrogen), um fluoróforo intercalante de bases de DNA, onde a intensidade da fluorescência emitida é diretamente proporcional a quantidade de DNA amplificado. Como referência endógena (normalizador), foi utilizado o gene *act-2* específico para esse percevejo nos estádios adulto, 5º ínstar e 4º ínstar, a fim de se padronizar as quantidades iniciais de cDNA.

A quantificação relativa do gene alvo *act-1* foi realizada utilizando triplicatas técnicas para cada repetição biológica, em volume final de 12,5µL, sendo 6,25µL de SYBR Green PCR Master Mix 2x contendo Rox, 0,5µL de cada iniciador [10µM] (F e R), 4,25 de água ultrapura autoclavada e 1µL de cDNA na diluição 1:10. Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final, foi realizada uma curva de desnaturação, que consiste na elevação da temperatura em 1°C/minuto, com o objetivo de verificar se, ao longo da reação, não houve amplificação de produtos inespecíficos, contaminações e formação de dímeros. Isso se justifica pelo fato de que cada molécula de DNA de dupla fita apresenta uma temperatura de desnaturação específica, sendo possível identificar a amplificação de produtos inespecíficos gerados em uma mesma reação.

A eficiência de amplificação de cada par de primers foi estimada utilizando diluições seriadas do cDNA (bulk) (1, 1:5, 1:25, 1:125 e

1:625). Os valores de Ct obtidos foram plotados em função do logaritmo de cada diluição e o índice de inclinação da reta foi utilizado para calcular a eficiência de amplificação dos primers, a partir da fórmula $E=[10^{-1/\text{slope}}]-1$. Os dados obtidos foram exportados para o programa Microsoft Excel, e utilizados para a quantificação relativa utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$ (valores de Ct do candidato normalizado) e posterior construção dos gráficos.

3.6 Resultados e Discussão

3.6.1 Padronização das Metodologias de fornecimento de dsRNA

3.6.1.1 Ensaios de fornecimento de dsRNA-GFP: oral e contato

Os resultados dos ensaios iniciais de fornecimento de dsRNA GFP via absorção oral (PA) e por contato dorsal (PG) revelaram que as moléculas de dsRNA não foram capazes de permanecerem estáveis no interior dos insetos (Figura 7), demonstrando que, para as duas vias de absorção testadas podem existir mecanismos de defesa ou de degradação das moléculas de dsRNA ou a necessidade de reavaliação das doses administradas.

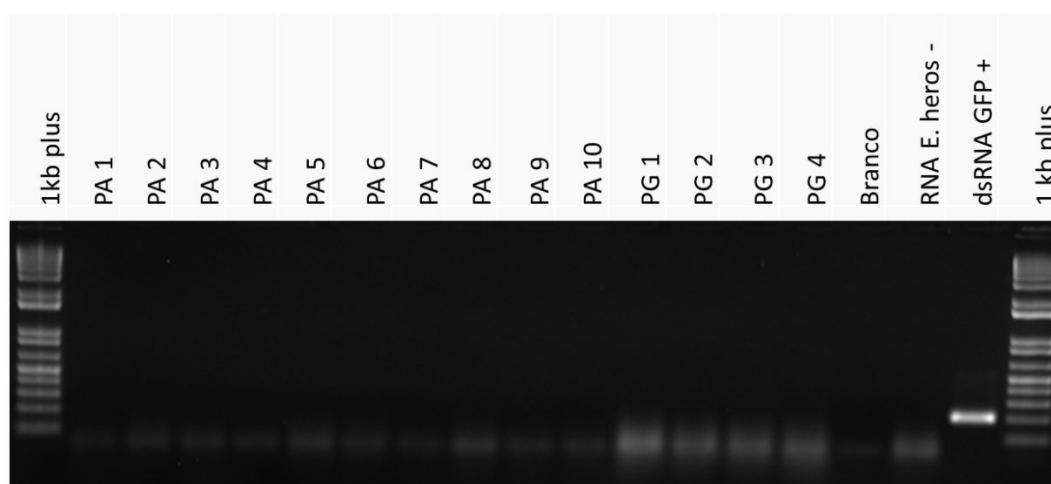


Figura 7. Detecção da molécula de dsRNA-GFP após aplicação ectópica em percevejo-marrom. Amostras de percevejos administrados dsRNA via oral (PA) e contato dorsal (PG) onde PA 1 = percevejo alimentado repetição 1; PA 2 = percevejo alimentado repetição 2; PA 3 = percevejo alimentado repetição 3; PA 4 = percevejo alimentado repetição 4; PA 5 = percevejo alimentado repetição 5; PA 6 = percevejo alimentado repetição 6; PA 7 = percevejo alimentado repetição 7; PA 8 = percevejo alimentado repetição 8; PA 9 = percevejo alimentado repetição 9; PA 10 = percevejo alimentado repetição 10; PG 1 = percevejo contato dorsal repetição 1; PG 2 = percevejo contato dorsal repetição 2; PG 3 = percevejo contato dorsal repetição 3; PG 4 = percevejo contato dorsal repetição 4.

3.6.1.2 Ensaio de Degradação de dsRNA

A análise *in vitro* de amostras de proteínas totais revelou a capacidade de degradação das moléculas de dsRNA a partir do extrato proteico do percevejo-marrom inteiro de 3º ínstar (NI 3), na amostra (NI 3/0) e diluída (NI 3/5); já para percevejos adultos, onde foram extraídos a Hemolinfa (HEA), sinalizou degradação somente na amostra sem diluição (HEA/0); e para o sistema digestivo de adultos (SDA), as degradações foram visualizadas nas amostras sem diluição (SDA/0) e (SDA/5). Para todas as amostras, nas diluições (1:25, 1:125 e 1:625), foi detectado a presença do dsRNA GFP estável (Figura 8).

Com base nestes resultados foi verificado que a degradação de nucleotídeos e outros compostos podem ser realizadas através de nucleases presentes em diversos órgãos do percevejo. Outras espécies de insetos sugadores apresentam forte degradação, corroborando com estes resultados como em saliva de *L. lineolaris* e *A. pisum* (ALLEN; WALKER, 2012; CHRTISTIAENS; SMAGGHE, 2014). Além disso, demonstrou-se que pode existir uma saturação, onde sugestiona estudos com elevadas doses de dsRNA para tornar sua aplicação viável em termos de capacidade de induzir o silenciamento, devido a manutenção de sua integridade e quantidade necessária para atingindo o alvo.

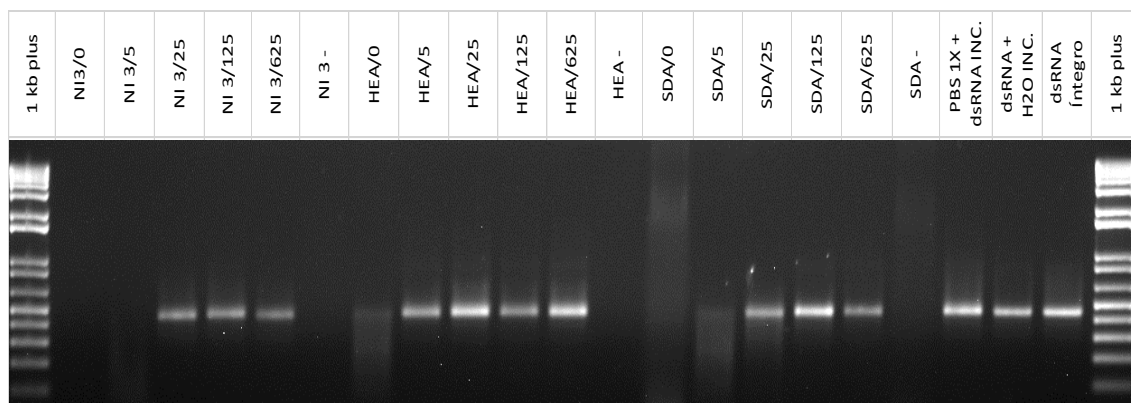


Figura 8. Degradação de dsRNA GFP por amostras de proteínas totais, em percevejo inteiro de 3º ínstar (NI 3) sendo NI 3/0 = Ninfas de 3º ínstar inteiras íntegra; NI 3/5 = Ninfas de 3º ínstar inteiras diluição 1:5; NI 3/25 = Ninfas de 3º ínstar inteiras diluição 1:25; NI 3/125 = Ninfas de 3º ínstar inteiras diluição 1:125; NI 3/625 = Ninfas de 3º ínstar inteiras diluição 1:625; NI 3- = Controle Negativo; Hemolinfa de adultos (HEA) sendo HEA/0 = Hemolinfa de Adultos íntegra; HEA/5 = Hemolinfa de Adultos diluição 1:5; HEA/25 = Hemolinfa de Adultos diluição 1:25; HEA/125 = Hemolinfa de Adultos diluição 1:125; HEA/625 = Hemolinfa de Adultos diluição 1:625; HEA - = Controle Negativo; e sistema digestivo de adultos (SDA) sendo SDA/0 = Sistema digestivo de adultos íntegro; SDA/5 = Sistema digestivo de adultos diluição 1:5; SDA/25 = Sistema digestivo de adultos diluição 1:25; SDA/125 = Sistema digestivo de adultos diluição 1:125; SDA/625 = Sistema digestivo de adultos diluição 1:625.

3.6.1.3 Saturação de dsRNA via contato dorsal

Altas concentrações de dsRNA podem favorecer a absorção em diversas vias de administração, causando saturação, dificultando a ação de nucleases presentes no percevejo-marrom. Sendo que, em sua maioria, quando as quantidades de 50µg, 100 µg e 200 µg foram administradas via contato dorsal, foi possível a detecção do dsRNA-GFP (Figura 9). Esses resultados corroboram para a validação da absorção em altas concentrações de dsRNA para sua estabilidade no interior do inseto.

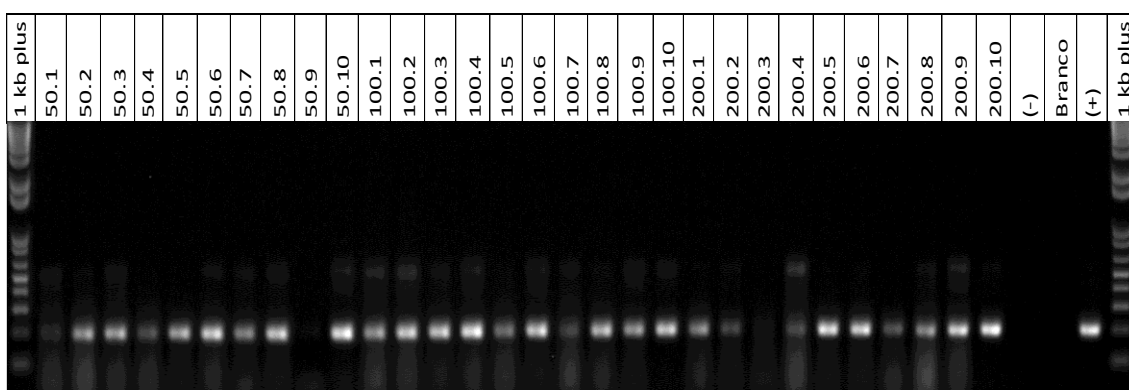


Figura 9. Saturação de dsRNA GFP em percevejos adultos via contato dorsal com concentrações de 50 µg, 100 µg e 200 µg. Sendo 50.1 = 50 µg repetição 1; 50.2 = 50 µg repetição 2; 50.3 = 50 µg repetição 3; 50.4 = 50 µg repetição 4; 50.5 = 50 µg repetição 5; 50.6 = 50 µg repetição 6; 50.7 = 50 µg repetição 7; 50.8 = 50 µg repetição 8; 50.9 = 50 µg repetição 9; 50.10 = 50 µg repetição 10; 100.1 = 100 µg repetição 1; 100.2 = 100 µg repetição 2; 100.3 = 100 µg repetição 3; 100.4 = 100 µg repetição 4; 100.5 = 100 µg repetição 5; 100.6 = 100 µg repetição 6; 100.7 = 100 µg repetição 7; 100.8 = 100 µg repetição 8; 100.9 = 100 µg repetição 9; 100.10 = 100 µg repetição 10; 200.1 = 200 µg repetição 1; 200.2 = 200 µg repetição 2; 200.3 = 200 µg repetição 3; 200.4 = 200 µg repetição 4; 200.5 = 200 µg repetição 5; 200.6 = 200 µg repetição 6; 200.7 = 200 µg repetição 7; 200.8 = 200 µg repetição 8; 200.9 = 200 µg repetição 9; 200.10 = 200 µg repetição 10.

Para a ação de silenciamento, via RNAi, diferentes concentrações de dsRNA são necessárias, de acordo com os vários organismos estudados, em função da sensibilidade ao RNAi e estruturas diferentes entre os alvos (TERENIUS et al., 2011). Neste sentido, pode beneficiar a dispersão ou o acúmulo do dsRNA, validando que as concentrações devem ser padronizadas para cada organismo específico, para obter uma quantidade ótima, para a realização e efetivação do silenciamento (SHAKESBY et al., 2009).

3.6.1.4 Ensaios de fornecimento via Translocação em vagem

Através das análises por PCR, foi observada a presença do dsRNA e sua integridade após 24h (Figura 10), sendo principalmente detectado nas secções da vagem próximo ao pedúnculo, local onde foi administrado o dsRNA. A estabilidade do dsRNA 24 horas, após a aplicação no tecido vegetal, evidencia o potencial de aplicação dessa tecnologia, tanto para ensaios de validação de genes em insetos pragas da soja e/ou seu uso potencial como estratégia de controle.

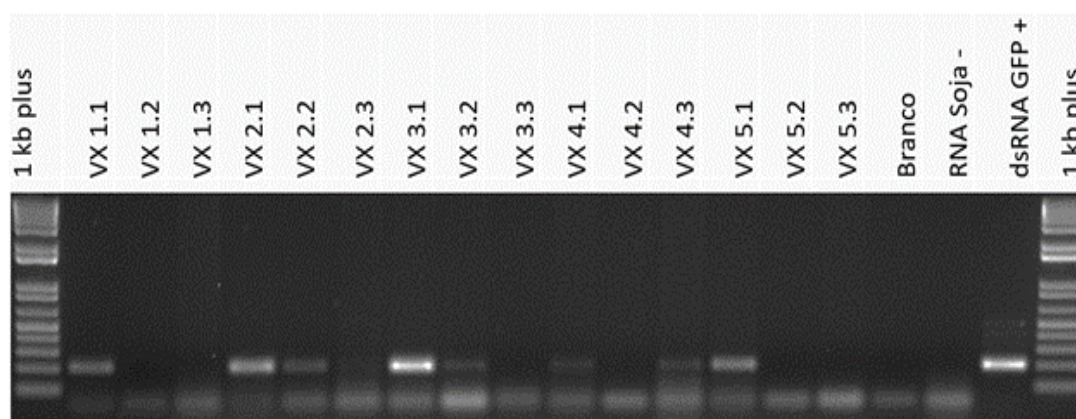


Figura 10. Vagens de soja seccionadas com translocação de dsRNA GFP. VX 1.1 vagem 1 secção 1, VX 1.2 vagem 1 secção 2, VX 1.3 vagem 1 secção 3, VX 2.1 vagem 2 secção 1, VX 2.2 vagem 2 secção 2, VX 2.3 vagem 2 secção 3, VX 3.1 vagem 3 secção 1, VX 3.2 vagem 3 secção 2, VX 3.3 vagem 3 secção 3, VX 4.1 vagem 4 secção 1, VX 4.2 vagem 4 secção 2, VX 4.3 vagem 4 secção 3, VX 5.1 vagem 5 secção 1, VX 5.2 vagem 5 secção 2, VX 5.3 vagem 5 secção 3.

Dada a variação no perfil de translocação entre as 5 vagens avaliadas, sugere-se que mais testes sejam conduzidos, tanto variando a dose como o tempo de incubação. Adicionalmente, sugere-se também ensaios com manutenção do fluxo hídrico, o que pode favorecer a translocação do dsRNA.

A presença do dsRNA nas sementes das vagens translocadas, foi avaliada via PCR qualitativo, não foi detectado a presença das moléculas na dose de 10 μ g do dsRNA fornecida em 50 μ L após o tempo 24 horas de absorção (Figura 11). Tal resultado reforça a necessidade manutenção de fluxo hídrico e maiores tempo de exposição, para alcançar níveis de maiores de absorção e translocação.

A estabilidade das moléculas de dsRNA no ambiente é outra característica importante. Li e colaboradores (2015) observaram uma alta

estabilidade do dsRNA sobre intensa exposição de radiação ultravioleta e até mesmo em temperaturas acima de 60°C.

Para os percevejos que foram alimentados a partir destas vagens contendo dsRNA-GFP, em sua maioria, foi confirmada a absorção e estabilidade do dsRNA em 24 horas (Figura 12). Tal resultado demonstra a possibilidade do emprego de RNAi através da absorção de dsRNA, com seu alimento direto e preferencial, embora seja demonstrada a necessidade de uma elevada dose da molécula. Estudos futuros visando a proteção das moléculas contra a ação de nucleases podem tornar o emprego da metodologia viável economicamente.

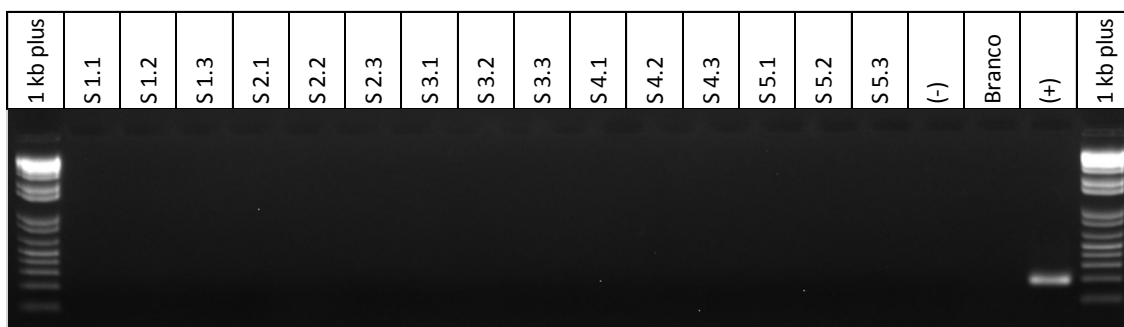


Figura 11. Translocação de dsRNA GFP em sementes das vagens com absorção via xilema. Sendo S1.1 = semente vagem 1 secção 1; S1.2 = semente vagem 1 secção 2; S1.3 = semente vagem 1 secção 3; S2.1 = semente vagem 2 secção 1; S2.2 = semente vagem 2 secção 2; S2.3 = semente vagem 2 secção 3; S3.1 = semente vagem 3 secção 1; S3.2 = semente vagem 3 secção 2; S3.3 = semente vagem 3 secção 3; S4.1 = semente vagem 4 secção 1; S4.2 = semente vagem 4 secção 2; S4.3 = semente vagem 4 secção 3; S5.1 = semente vagem 5 secção 1; S5.2 = semente vagem 5 secção 2; S5.3 = semente vagem 5 secção 3.

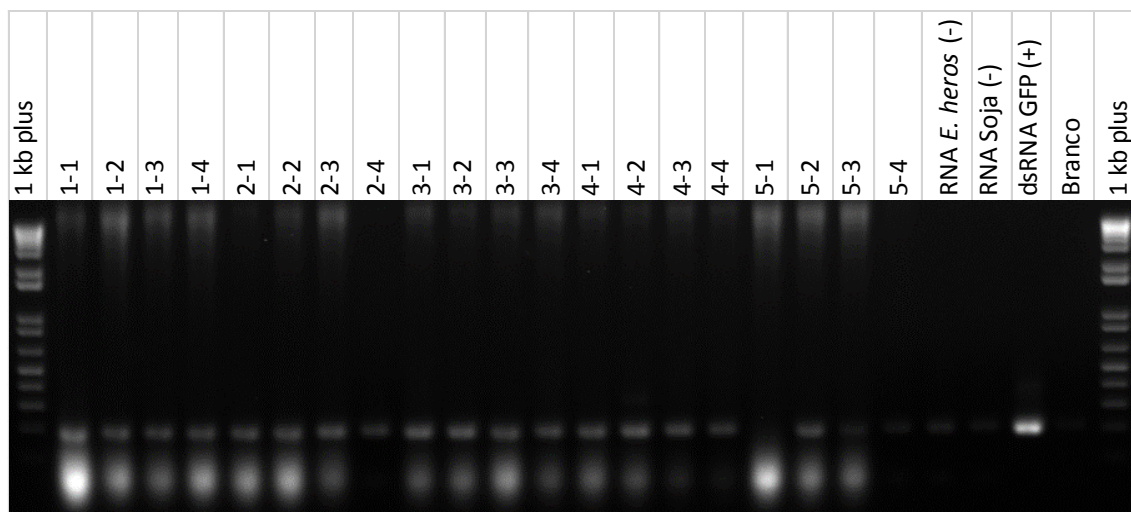


Figura 12. Percevejos alimentados em vagens contendo dsRNA GFP translocado. Sendo 1-1 = percevejo na vagem 1 repetição 1; 1-2 = percevejo na vagem 1 repetição 2; 1-3 = percevejo na vagem 1 repetição 3; 1-4 = percevejo na vagem 1 repetição 4; 2-1 = percevejo na vagem 2 repetição 1; 2-2 = percevejo na vagem 2 repetição 2; 2-3 = percevejo na vagem 2 repetição 3; 2-4 = percevejo na vagem 2 repetição 4; 3-1 = percevejo na vagem 3 repetição 1; 3-2 = percevejo na vagem 3 repetição 2; 3-3 = percevejo na vagem 3 repetição 3; 3-4 = percevejo na vagem 3 repetição 4; 4-1 = percevejo na vagem 4 repetição 1; 4-2 = percevejo na vagem 4 repetição 2; 4-3 = percevejo na vagem 4 repetição 3; 4-4 = percevejo na vagem 4 repetição 4.

A detecção da estabilidade do dsRNA e sua translocação na vagem até atingir as sementes e os percevejos durante a alimentação, também foram avaliados quando o fluxo hídrico foi mantido no decorrer do experimento com base nas análises de PCR das amostras do Tratamento 1 (50µg/300µL dsRNA-GFP) do ensaio de validação de silenciamento. Neste caso, foi possível detectar a presença do dsRNA GFP nas sementes (Figura 13) e nos percevejos alimentados sobre estas vagens (Figura 14). Tal resultado corrobora com os resultados apresentados por GOSH et al. (2018), onde utilizando insetos Hemipteras, também observou a translocação do dsRNA em feijão vagem e absorção nos percevejos *Halyomorpha halys* e *Murgantia histrionica*, que tiveram tiveram os genes silenciados absorvendo dsRNA destas vagens, quando a dose 20µg/300µL foi administrada.

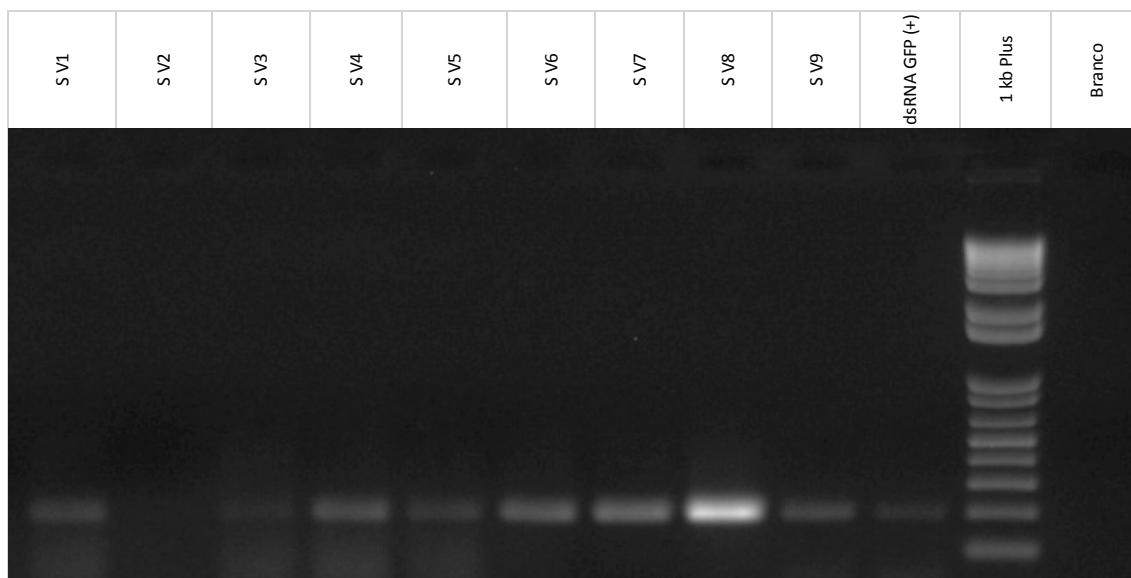


Figura 13. Translocação de dsRNA GFP em sementes das vagens com absorção via xilema do Tratamento 1 ($50\mu\text{g}/300\mu\text{L}$ dsRNA GFP). Sendo S V1 = sementes da vagem 1; S V2 = sementes da vagem 2; S V3 = sementes da vagem 3; S V4 = sementes da vagem 4; S V5 = sementes da vagem 5; S V6 = sementes da vagem 6; S V7 = sementes da vagem 7; S V8 = sementes da vagem 8; S V9 = sementes da vagem 9.

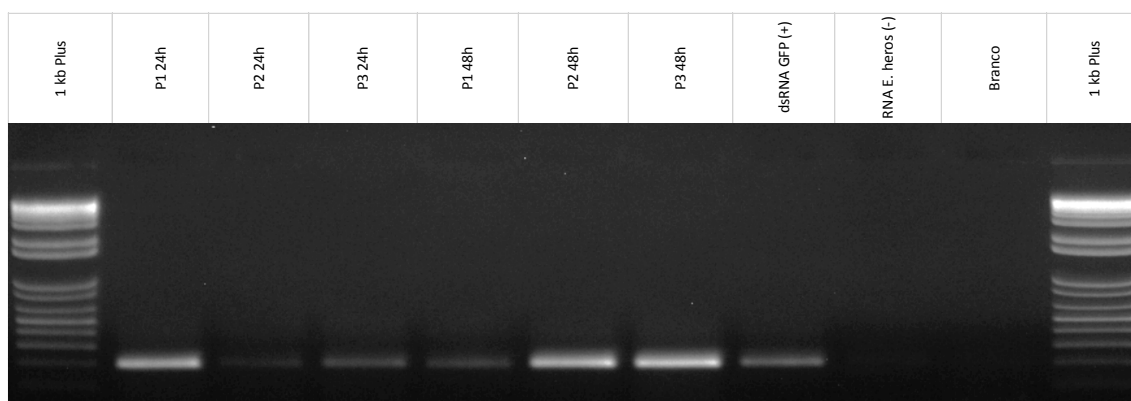


Figura 14. Percevejos alimentados em vagens do Tratamento 1 ($50\mu\text{g}/300\mu\text{L}$ dsRNA GFP). Sendo P1 24h = percevejo repetição 1 com coleta em 24h; P2 24h = percevejo repetição 2 com coleta em 24h; P3 24h = percevejo repetição 3 com coleta em 24h; P1 48h = percevejo repetição 1 com coleta em 48h; P2 48h = percevejo repetição 2 com coleta em 48h; P3 48h = percevejo repetição 3 com coleta em 48h.

3.6.2. Validação das metodologias de fornecimento de dsRNA

3.6.2.1 Análise da Expressão do gene *act-1*

Para ser possível verificar a capacidade de indução de silenciamento com base nas metodologias padronizadas neste trabalho, o gene *act-1* foi escolhido para teste. Anteriormente de ser utilizado como alvo nos ensaios de fornecimento de dsRNA, sua expressão foi avaliada no percevejo-

marrom adulto, 5º ínstar e 4º ínstar. De acordo com os resultados de qRT-PCR realizado, o gene é ativamente expresso nestes estádios do inseto (Figura 15). Nesta população em específico, ninfas de 5º ínstar possuem este gene 2 vezes e 4º ínstar 2,65 vezes mais expresso que o Adulto.

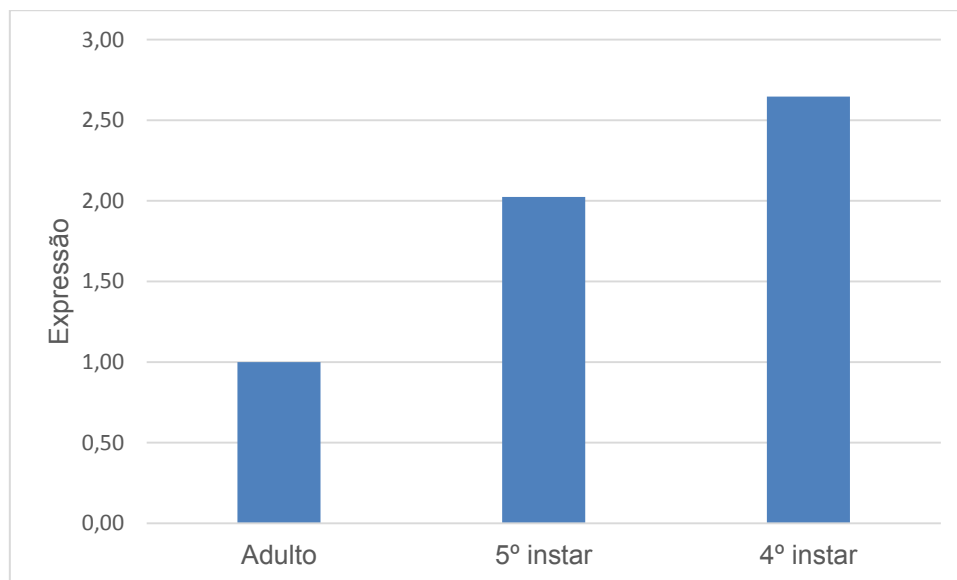


Figura 15. Expressão do gene *act-1* em percevejo marrom de 4º ínstar, 5º ínstar e Adulto.

3.6.2.2 Determinação dos níveis de silenciamento gênico de *act-1*

As análises de detecção do silenciamento no método via contato, onde 50µg/300µL de dsRNA *act-1* foi administrado sobre o inseto, simulando uma gota de pulverização com maior volume, detectou o silenciamento de 30% do gene *act-1* no tratamento dsact-1 e de 12% no tratamento dsact1+EDTA, ambos comparados ao controle dsGFP (Figura 16).

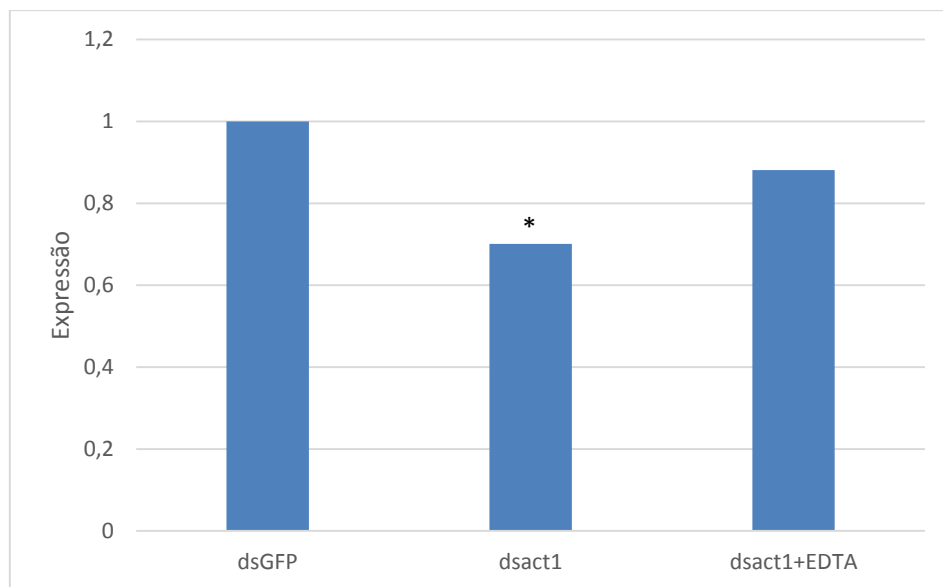


Figura 16. Expressão do gene *act-1* no percevejo-marrom em contato com dsRNA onde dsGFP = Controle com água + dsRNA GFP (1); dsact1 = água + dsRNA *act-1* (0,70); dsact1+EDTA = água + dsRNA *act-1* + EDTA (0,88). Médias seguidas de * diferem a $P < 0,05$.

Nos ensaios utilizando percevejos-marrom alimentados em vagens de soja translocadas com dsRNA *act-1* (50µg/300µL), diferentemente do observado nos ensaios de aplicação dorsal, não foi possível detectar níveis significativos de silenciamento do gene *act-1*, o que pode sinalizar degradação ou até mesmo ações de defesa no inseto, durante a passagem das moléculas no trato digestivo. Em contrapartida, níveis maiores que o controle foi observado no tratamento com *act-1* + EDTA (50µg/300µL) (Figura 17).

Em estudos com *S. gregária* (WYNANT et al., 2014), *L. decemlineata* (SPIT et al., 2017) e *B. mori* (ARIMATSU, et al., 2007; LIU et al., 2012), os autores demonstram a evidência de nucleases presentes no intestino contribuindo para a degradação de moléculas de dsRNA, dificultando a estabilidade e ação de silenciamento através da alimentação por via oral. Em contrapartida, Gosh et al. (2018), alimentando percevejos em feijão vagem, translocadas com dsRNA (20µg/300µL), obtiveram redução de 4,5 vezes do gene específico (*JHAMT*) do percevejo *Halyomorpha halys*, revelando a necessidade de padronização da dose até mesmo em insetos da mesma família, neste caso Pentatomidae. Como esperado, os resultados também revelam que a dose tem dependência do tipo de fornecimento de dsRNA utilizado.

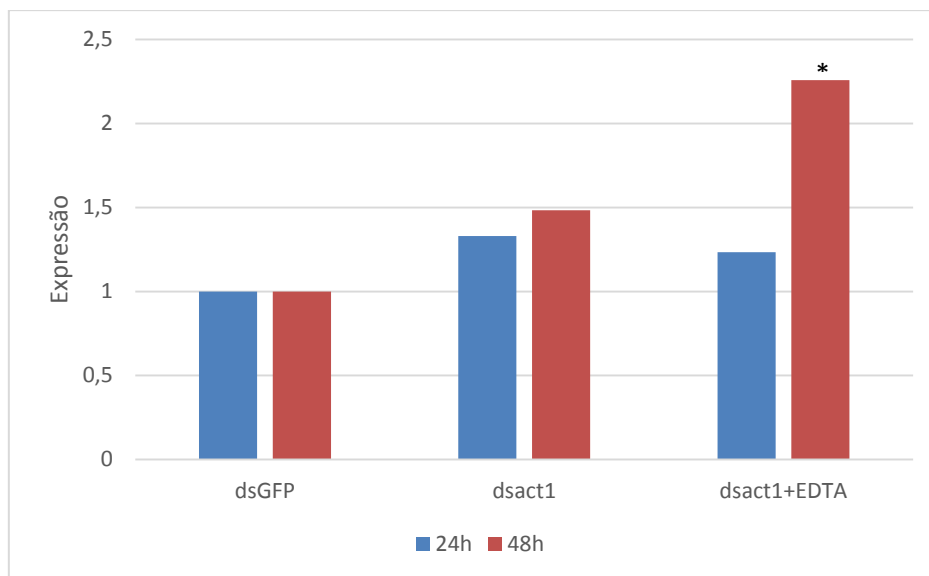


Figura 17. Expressão do gene *act-1* no percevejo-marrom alimentados em vagens translocadas com dsRNA onde dsGFP = Controle com água + dsRNA GFP; dsact1 = água + dsRNA *act-1*; dsact1+EDTA = água + dsRNA *act-1* + EDTA. Em dois tempos de coleta (24h e 48h). Médias seguidas de * diferem a $P < 0,05$.

Adicionalmente, outros fatores podem interferir com a maquinaria de silenciamento, além da degradação de dsRNA na saliva ou intestino do inseto, com diversas faixas de pH no sistema digestivo. Altas concentrações de dsRNA também colaboram com o efeito *reboot* do complexo de silenciamento, onde o gene é altamente expresso como forma de manter a síntese da proteína envolvida. Tal fato pode ser evidenciado no tratamento dsact1+EDTA, onde houve uma maior expressão significativa do gene. O EDTA, um agente quelante para cátions divalentes (Ca_2^+ , Mg_2^+ e Mn_2^+), pode agir como protetor de molécula de dsRNA sendo assim, com maior conservação no intestino, gerando uma maior concentração interna e favorecendo este efeito *reboot*.

Neste sentido, Castellanos et al., (2018), demonstrou que o EDTA inibiu a degradação de nucleases na saliva do percevejo-marrom, obtendo melhores taxas (via alimentação), de mortalidade, colaborando com resultados de proteção do dsRNA em intestino médio de *C. puncticollis* (PRENTICE et al., 2017) e em hemolinfa de *Manduca sexta* (GAR BUTT et al., 2013), com isto, sugerindo o uso de EDTA como agente de proteção viral via alimentação.

3.6.2.3 Determinação dos níveis de mortalidade

A mortalidade do percevejo-marrom após o tratamento com dsRNA pelo fornecimento alimentar, através de vagens de soja contendo dsRNA translocado, foi avaliada, sendo obtidos níveis de 50% de mortalidade quando os insetos foram tratados com vagens translocadas com 50ug/300 uL de *dsact-1* (T2). A adição do agente quelante no tratamento *dsact-1* + EDTA (T3), contribuiu para o alcance de níveis de 65% após 96 horas. Embora não tenha sido possível confirmar a ocorrência do silenciamento via RT-qPCR, tais resultados indicam que o método foi eficiente, sendo capaz de conferir uma mortalidade eficaz com tempo reduzido quando comparado a outros estudos. Por exemplo, utilizando uma dieta artificial contendo 320ng/μL de dsRNA similar ao gene *act-2* em percevejo-marrom, Castellanos et al. (2018) obteve 33% de mortalidade. Com a adição de protetores a solução, como lipossomo, os níveis alcançados foram de 42%, e 22% de mortalidade e com EDTA, ambos apenas com 14 dias de alimentação. Estes resultados sugerem que o gene *act-1* é altamente expresso e com alta influência na sobrevivência do percevejo-marrom e o método via alimentação em vagem de soja contendo dsRNA, pode influenciar mais rapidamente na mortalidade. O efeito da dose também pode ter efeito direto nos resultados obtidos, sendo que doses menores devem ser testadas em trabalhos futuros nesta espécie visando determinar o custo benefício do método.

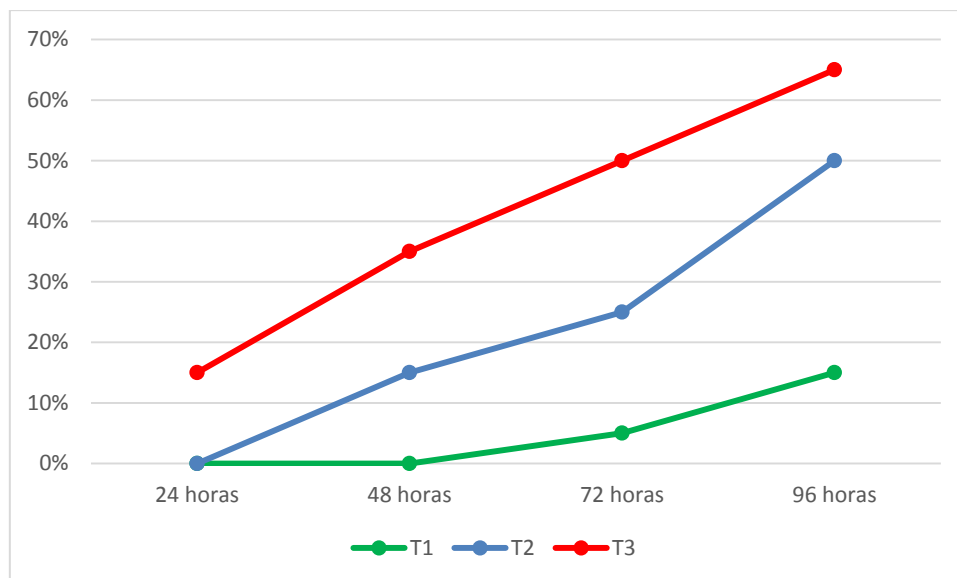


Figura 18. Mortalidade do percevejo-marrom alimentado em vagens translocadas com dsRNA onde T1 = Controle com água + dsRNA GFP; T2 = água + dsRNA act-1; T3 = água + dsRNA act-1 + EDTA.

3.7 Conclusões

A absorção e estabilidade de dsRNA no método via alimentação em vagens de soja, colaboram para uma realização mais natural com alto potencial de mortalidade.

O método de contato direto gerou redução na expressão do gene alvo, sua aplicação é prática podendo ser utilizado para estudos funcionais de silenciamento gênico e controle do *E. heros*.

Com o estabelecimento do fluxo contínuo em vagens de soja, foi capaz de translocar e estabilizar dsRNA nas valvas e suas sementes.

A absorção e estabilidade de moléculas de dsRNA foi satisfatória nos dois métodos de administração (alimentar em vagens de soja e contato direto).

O dsRNA similar ao gene *act-1* foi capaz de promover redução significativa em sua expressão em contato direto com a solução e gerar altas taxas de mortalidade via alimentação em vagens de soja para o *E. heros*.

4 Referências

ABDELLATEF, E.; WILL, T.; KOCH, A.; IMANI, J.; VILCINSKAS, A.; KOGEL, K. Silencing the expression of the salivary sheath protein causes transgenerational feeding suppression in the aphid *Sitobion avenae*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, p. 849–857, 2015.

ALLEN, M. L.; WALKER, W. B. Saliva of *Lygus lineolaris* digests double stranded ribonucleic acids. **J Insect Physiol.** 58:391–396. 2012.

ALVES, S.B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S.B.(Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.21-37.

AOKI, K.; MORIGUCHI, H.; YOSHIOKA, T.; OKAWA, K.; TABARA, H., In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. **The EMBO journal**, v. 26, n. 24. p. 5007-5019. 2007.

ARIMATSU, Y.; FURUNO, T.; SUGIMURA, Y.; TOGOH, M.; ISHIHARA, R.; TOKIZANE, M. et al. Purification and properties of double-stranded RNA-degrading nuclease, dsRNase, from the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. **J Insect Biotechnol Sericol.** 62:57–62. 2007.

BARBOSA, A. S.; LIN, C. J. **Silenciamento de genes com RNA interferência: um novo instrumento para investigação da fisiologia e fisiopatologia do córtex adrenal**. São Paulo, SP, v.48, n.5, p. 612-619, out. 2004.

BARRA, G. B.; SANTA RITA, T. H.; VASQUES J. A.; CHIANCA, C. F.; LFA, N.; SSS, C. EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from ex vivo degradation in blood samples. **Clin Biochem.** 48:976–981. 2015.

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

BIANCO, R.; NISHIMURA, M. **Efeito do tratamento de sementes de milho no controle do percevejo barriga verde (*Dichelops furcatus*)**. Congresso Brasileiro De Entomologia. Resumos, Sociedade Entomológica do Brasil. p.203, 1998.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2013/2014 a 2023/2024**. Brasília: MAPA/ACS, 2018.

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

CARTHEW, R.W.; SONTHEIMER, E.J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**. 2009 Feb 20;136(4):642-55

CASTELLANOS, N. L.; SMAGGHE, G.; SHARMA, R.; OLIVEIRA, E. E.; CHRISTIAENS, O. Liposome encapsulation and EDTA formulation of dsRNA targeting essential genes increase oral RNAi-caused mortality in the Neotropical stink bug *Euschistus heros*. **Pest Management Science**, v. 75, Issue 2, pg.537-548. 2018

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

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

CHOCOROSQUI, V. R.; PANIZZI, A. R. Impact of cultivation systems on *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) population and damage and its chemical control on wheat. **Neotropical Entomology**. vol.33, n.4, p.487-492, 2004.

CHRISTIAENS, O.; SMAGGHE, G. The challenge of RNAi-mediated control of hemipterans. **Curr Opin Insect Sci** 6:15–21. 2014.

CIVIDANES, F.J. **Determinação das exigências térmicas de *Nezara viridula* (L., 1758), *Piezodorus guildinii* (West., 1837) e *Euschistus heros* (Fabr., 1798) (Heteroptera: Pentatomidae) visando ao seu zoneamento ecológico**. 1992. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, Piracicaba, 1992.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira – Grãos, v4 – Safra 2016/2017, n.12 – Décimo Segundo Levantamento**. Brasília: Conab, 2017.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira** – Grãos, v9 – Safra 2017/2018, n.9 – Nono Levantamento. Brasília: Conab, 2018.

CORRÊA-FERREIRA, B. S. **Utilização do parasitóide de ovos *Trissolcus basalís* (Wollaston) no controle de percevejos da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo. 42p. (Circular Técnica, 11). 1993.

CORRÊA-FERREIRA, B. S. Suscetibilidade da soja a percevejos na fase anterior ao desenvolvimento das vagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1067-1072, 2005.

CORRÊA-FERREIRA, B.S.; LIMA, D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Ocorrência e dano de percevejos em cultivares de soja de crescimento determinado e indeterminado. In: **Reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil**, 31, 2010, Embrapa Soja, 2010, p. 78-80.

CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MACHADO, E.M.; HOFFMANN-CAMPO, C.B. Sobrevivência e desempenho reprodutivo do percevejo marrom *Euschistus heros* (F.) na entressafra da soja. **Reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil**, 31. 2010, Embrapa Soja, 2010b, p. 81-83.

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PANIZZI, A. R. **Percevejos da soja e seu manejo**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo. 45p. (Circular Técnica, 24). 1999.

DEGRANDE, P. E.; VIVAN, L. M. **Pragas da Soja**. (capítulo 8). Tecnologia e Produção: Soja e Milho. Fundação MS. 52p. 2012. Disponível em: <http://www.fundacaoms.org.br/base/www/fundacaoms.org.br/media/attachments/21/21/5385dc2c47c064f727a0d39a094cf2b093463e25dcf50_08-pragas-da-soja_432333550.pdf> Acesso em: 07, jun., 2017.

DEPIERI, R.A. Danos em sementes de soja *Glycinemax* (L.) Merr. (Fabaceae), morfologia dos estiletos e enzimas salivares de pentatomídeos fitófagos. 2010. 104p. **Tese (Doutorado em ciências biológicas)** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

DIEZ-RODRIGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**. v. 30, n. 2, p. 311-316, 2001.

EAMENS, A.; WANG, M.-B.; SMITH, N. A.; WATERHOUSE, P. M. RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. **Plant Physiology**. Volume 147, 456-468, 2008.

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

FERREIRA, S. B.; PEIXOTO, M. F.; OLIVEIRA, R. R. C.; QUINTINO, G. B.; BORTOLANI, P. A. A. Danos causados por *Euschistus heros* (FABR. 1974) em soja (*Glycine max*). **Gl. Sci Technol**, Rio Verde, v.11, n.03, p.01-09, set/dez. 2018

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. 6669, p. 806-811, 1998. ISSN 00280836.

FISHILEVICH, E.; VELEZ, A. M.; KHAJURIA, C.; FREY, M. L. F.; HAMM, R. I.; WANG, H.; SCHULENBERG, G. A.; BOWLING, A. J.; PENCE, H. E.; GANDRA, P.; ARORA, K.; STORER, N. P.; NARVA, K. E.; SIEGFRIED, B. D. Use of chromatin remodeling ATPases as RNAi targets for parental control of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) and Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 71, 58-71, 2016.

GARBUTT, J.S.; BELLÉS, X.; RICHARDS, E.H.; REYNOLDS, S. E. Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*. **J Insect Physiol**. 59:171–178. 2013.

GHOSH, S. K. B.; HUNTER, W. B.; PARK, A. L.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E. Double strand RNA delivery system for plant-sap-feeding insects. **Plos One**, 12(2):e0171861.doi:10.1371/journal.pone.0171861. 2017.

GHOSH, S.K., HUNTER, W.B., PARK, A.L., GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Double-stranded RNA Oral Delivery Methods to Induce RNA Interference in Phloem and Plant-sap-feeding Hemipteran Insects. **J. Vis. Exp.** (135), e57390, doi:10.3791/57390. 2018.

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

HAMMOND, T. M.; XIAO, H.; BOONE, E. C.; DECKER, L. M.; LEE, S. A.; PERDUE, T. D.; PUKKILA, P. J.; SHIU, P. K. Novel proteins required for meiotic silencing by unpaired DNA and siRNA generation in *Neurospora crassa*. **Genetics**, v. 194, p.91–100, 2013.

HIRAKURI, M.H.; LAZZAROTTO, J. J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. **Documentos 349**. Embrapa Soja, Londrina, Paraná. 30 p, 2014.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo. 70p. (Circular Técnica 30). 2000.

HUNTER, W. B.; GLICK, E.; PALDI, N.; BEXTINE, B. R. Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression. **Southwestern Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 85-87, 2012. ISSN 0147-1724.

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

JORGENSEN, R. A.; CLUSTER, P. D.; ENGLISH, J.; QUE, Q.; NAPOLI, C. A., Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. **Plant molecular biology**, v. 31, n. 5. p. 957-973. 1996.

KOCH, A.; KOGEL, K.H. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediate gene silencing. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 821831, 2014.

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

KUSS, C. C.; ROGGIA, R. C. R. K.; BASSO, C. J.; OLIVEIRA, M. C. N.; PIAS, O. H. C.; ROGGIA, S. Controle de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) em soja com inseticidas químicos e biológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 51(5), 527-536. 2016.

KUSS-ROGGIA, R.C.R. **Distribuição espacial e temporal de percevejos da soja e comportamento de *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) (Hemiptera: Pentatomidae) na soja (*Glycine max* (L.) Merrill) ao longo do dia**. 2009. 128f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

LEMES, E.; GAVASSONI, W.L. Ferrugem asiática da soja. In: **Doenças da soja: melhoramento genético e técnica de manejo**. Campinas, SP: Millennium Editora, 2015.

LI, H.; GUAN, R.; GUO, H.; MIAO, X. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. **Plant, cell & environment**, v. 38, n. 11, p. 2277-2285, 2015. ISSN 1365-3040.

LI, X.X.; ZHANG, M.Y.; ZHANG, H.Y. RNA Interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 3, Mar. 2011.

LILLEY, C. J.; BAKHETIA, M.; CHARLTON, W. L.; URWIN, P. E. Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 701-711, 2007. ISSN 1364-3703.

LIU, J.; SWEVERS, L.; IATROU, K.; HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Bombyx mori DNA/RNA non-specific nuclease: expression of isoforms in insect culture cells, subcellular localization and functional assays. **J Insect Physiol.** 58:1166–1176. 2012.

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

LOURENÇO, I. T. **Validação funcional de genes envolvidos com estresse de Meloidogyne incognita via RNA interferente in planta**. 2014. Tese (Doutorado). Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília.

MAMTA, B.; RAJAM, M. V. RNAi technology: a new platform for crop pest control. **Physiol Mol Biol Plants**. 23(3):487–501. July–September 2017.

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

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

MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Resistência de lepidópteros-praga a inseticidas na cultura do algodão no Brasil. **Revista Brasileira De Oleaginosas e Fibras**. Campina Grande. v. 10, n. 3, p. 1167-1182, 2006.

MARTINEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; URLAUB, H.; LÜHRMANN, R.; TUSCHL, T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. **Cell**, v. 110, n. 5, p. 563-574, 2002. ISSN 0092-8674

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

MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 509-539.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **Plant Cell**, Rockville, v. 2, n. 4, p. 279-289, Apr. 1990.

OBBARD, D. J.; GORDON, K. H.; BUCK, A. H.; JIGGINS, F. M. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1513, p. 991-115, 2009. ISSN 0962-8436.

OLIVEIRA, J., MARIANO, P., PEREIRA, C., THEODORO, C., TOMQUELSKI, G.V. Eficiência de inseticidas no controle do percevejo-marrom. Resumos expandidos da **XXXV Reunião de pesquisa de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 282 p.

PANIZZI A. R. History and Contemporary Perspectives of the Integrated Pest Management of Soybean in Brazil, **Neotropical Entomology**. 42:119–127, Springer-Verlag. 2013.

PANIZZI, A. R. Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). In: CAPINERA, J.L. (Ed.). Encyclopedia of Entomology. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, 2004.

PANIZZI, A. R.; NIVA, C. C. Overwintering strategy of the brown stink bug in northern Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 509-511, 1994.

PANIZZI, A. R.; SILVA, F.A.C. **Insetos Sugadores De Sementes (Heteroptera)**. Cáp.12, Bioecologia e nutrição de insetos: bases para o manejo integrado de pragas. 2009.

PANIZZI, A.R.; VIVAN, L.M. Seasonal abundance of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* in overwintering sites and the breaking of dormancy. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 82, p. 213-217, 1997.

PATERNIANI, E. Agricultura sustentável nos trópicos. **Estudos avançados**. v. 43, n. 15, p. 303-326, 2001.

PERRIMON, N.; NI, J.Q.; PERKINS, L. In vivo RNAi: today and tomorrow. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, v. 2, n. 8, p. 1-11, June 2010.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; D. G. DE S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004.

PRENTICE, K.; CHRISTIAENS, O.; PERTRY, I.; BAILEY, A.; NIBLETT C.; GHISLAIN, M. et al. RNAi-based gene silencing through dsRNA injection or ingestion against the African sweet potato weevil *Cylas puncticollis* (Coleoptera:Brentidae). **Pest Manag Sci**. 73:44–52. 2017.

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

RIBEIRO, B.M.R.; PINEDO, F.J.R. Baculovírus recombinante para controle de praga. **Biotechnol. Ciênc. Desenv.**, v. 22, p.50-58, 2001.

RIBEIRO, F. C.; ROCHA, F. S.; ERASMO, E. A. L.; MATOS, E. P.; COSTA, S. J. Manejo com inseticidas visando o controle de percevejo marrom na soja intacta. **Revista de Agricultura Neotropical**. v. 3, n. 2, p. 48-53, 2016.

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; THOMPSON, H.E. How a soybean plant develops. Ames: Iowa State University of Science and Technology Cooperative Extension Service, 1982. 20 p. (**Special Report, 53**)

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

ROSSO, M.; JONES, J.; ABAD, P. RNAi and functional genomics in plant parasitic nematodes. **Annual review of phytopathology**, v. 47, p. 207-232, 2009. ISSN 0066-4286.

SALVADORI, J.R.; PEREIRA, P.R.V. da S.; CORRÊA-FERREIRA, B.S. Pragas ocasionais em lavouras de soja no Rio Grande do Sul. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 34 p. (**Embrapa Trigo. Documentos, 91**).

SAN MIGUEL, K.; SCOTT, J.G. The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar applied insecticide. **Pest Management Science**, v. 38, p. 2277-2285, 2015.

SCOTT, J. G.; MICHEL, K.; BARTHOLOMAY, L. C.; SIEGFRIED, B. D.; HUNTER, W. B.; SMAGGHE, G. Towards the elements of successful insect RNAi. **J Insect Physiol.** 59:1212–1221. 2013.

SHAKESBY, A.; WALLACE, I.; ISAACS, H.; PRITCHARD, J.; ROBERTS, D.; DOUGLAS, A. A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 39, n. 1, p. 1-10, 2009. ISSN 0965-1748.

SIJEN, T.; FLEENOR, J.; SIMMER, F.; THIJSSSEN, K. L.; PARRISH, S.; TIMMONS, L.; PLASTERK, R. H.; FIRE, A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 465-476, 2001. ISSN 0092-8674.

SILVA, M. T. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; SOSA-GOMÉZ, D. R. Erro e resistência. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas-RS, v. 8, n. 82, p. 22-25, 2006.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORSO, I. C.; MORALES, L. Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and metamidophos in the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). **Neotropical Entomology**. v. 30, n. 2, p. 317-320, 2001.

SPIT, J.; PHILIPS, A.; WYNANT, N.; SANTOS, D.; PLAETINCK, G.; VANDEN BROECK, J. Knockdown of nuclease activity in the gut enhances RNAi efficiency in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, but not in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Insect Biochem Mol Biol.** 81:103–116. 2017.

TERENIUS, O.; PAPANICOLAOU, A.; GARBUTT, J. S.; ELEFThERIANOS, I.; HUVENNE, H.; KANGINAKUDRU, S.; ALBRECHTSEN, M.; AN, C.; AYMERIC, J.-L.; BARTHEL, A. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 2, p. 231-245, 2011. ISSN 0022-1910.

THAKUR, N.; UPADHYAY, S.K.; VERMA, P.C.; CHANDRASHEKAR, K.; TULI, R.; SINGH, P.K. Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase A gene. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, p.87235, 2014.

TIAN, H.G.; PENG, H.; YAO, Q.; CHEN, H.X.; XIE, Q.; TANG, B.; ZHANG, W.Q. Developmental control of a Lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. **PloS One**, San Francisco, v. 4, n. 7, July 2009.

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

TUELHER, E. S.; SILVA, E. H.; RODRIGUES, H. S.; HIROSE, E.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E. Area-wide spatial survey of the likelihood of insecticide control failure in the neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. **J Pest Sci** (2004) 91:849–859, Springer Berlin Heidelberg. 2018.

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

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICKE, R. **Biologia molecular do gene**. Artmed Editora, 2015.

WILL, T; VILCINSKAS, A. Aphid-proof plants: biotechnology-based approaches for aphid control. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, v. 136, p. 179–203, 2013. YIN, C.; JURGENSON, J.E. ; HULBERT, S.H. Development of a host-induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. **Mol. Plant Microbe Interact**, v. 24, p. 554-561, 2010.

WILLIAMS, R.N.; PANAIÁ, J.R.; MOSCARDI, F.; SICHMANN, W.; ALLEN, G.E.; GREENE, G. L.; LASCA, D.H.C. **Principais pragas da soja no estado de São Paulo: reconhecimento, métodos de levantamento e melhor época de controle**. São Paulo: Secretaria de Agricultura, CATI, 1973. p. 1-18.

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

WYNANT N.; SANTOS, D.; VERDONCK, R.; SPIT, J.; VAN WIELENDAELE, P.; VANDEN BROECK, J. Identification, functional characterization and phylogenetic analysis of double stranded RNA degrading enzymes present in the gut of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Insect Biochem Mol Biol**. 46:1–8. 2014.

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**. 19:683–693. 2010.

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

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

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