



# Universidade de Brasília

Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular da Universidade de  
Brasília

VALIDAÇÃO DA ESTABILIDADE DE ESTRUTURAS DE dsRNA PARA USO  
NO SILENCIAMENTO GÊNICO DE INSETOS-PRAGA: AVALIAÇÃO NA  
PLANTA E NO INSETO ALVO

Autora: Rayssa Almeida Garcia

Orientadora: Maria Fátima Grossi de Sá

Brasília - DF

2015



Universidade de Brasília

VALIDAÇÃO DA ESTABILIDADE DE ESTRUTURAS DE dsRNA PARA USO  
NO SILENCIAMENTO GÊNICO DE INSETOS-PRAGA: AVALIAÇÃO NA  
PLANTA E NO INSETO ALVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do  
Título de Mestre em Biologia Molecular

Orientadora: Maria Fátima Grossi de Sá

Brasília - DF

2015

Dissertação de autoria de Rayssa Almeida Garcia, intitulada “VALIDAÇÃO DA ESTABILIDADE DE ESTRUTURAS DE dsRNA PARA USO NO SILENCIAMENTO GÊNICO DE INSETOS-PRAGA: AVALIAÇÃO NA PLANTA E NO INSETO ALVO”, apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, em (13/02/2015), defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

---

Prof. Dra. Maria Fátima Grossi de Sa

Orientador

---

Prof. Dra. Janice Barbosa de Almeida

Institut National de la Recherche Agronomique - INRA

---

Prof. Dr. Robert Miller

Universidade de Brasília - UnB

---

Prof. Dra. Roberta Ramos Coelho

Embrapa Cenargen

Brasília-DF

2015

Dedico esta obra

Em primeiro lugar, à Deus, pelo amor incondicional e pela oportunidade de me permitir crescer a cada dia.

Aos meus pais, Cleone José Garcia e Marijalma Almeida Garcia, por me proporcionarem amor, carinho e me ensinado como respeitar o próximo, por serem minha família tão querida e amada.

À minha irmã, Paulline Almeida Garcia, por todo o companheirismo e palavras sábias e ao meu primo, Alexandre Henrique Garcia, por todas as risadas nos momentos de tensão.

A minha orientadora, professora Maria Fátima Grossi de Sá, por ter me aceitado em sua equipe do Laboratório de Interação Molecular Planta Praga e me proporcionado a oportunidade de crescimento e aprendizado, além de ser exemplo de dedicação e trabalho árduo.

Ao meu co-orientador, Leonardo Lima Pepino Macedo, por toda a paciência e dedicação, pela confiança e pelas vezes que escutei "é errando que se aprende".

## Agradecimentos

À Universidade de Brasília – UnB e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, por ser um centro de excelência, que me ofereceu as condições necessárias para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus inestimáveis amigos Danila Cabral do Nascimento, Joaquin Felipe Rocca Paixão e Isabela Tristan Lourenço, pela ajuda e pelas gargalhadas.

A equipe do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I e a todas as pessoas que por aqui passaram durante a fase do meu mestrado.

Meus agradecimentos a todos que trabalham na plataforma de criação de insetos do Cenargen.

As amigas de infância Luana, Marina, Gabriella, Ivy, Laura, Rafaela, Luna e Carolina, pelo companheirismo, ombro amigo e mais de 20 anos de amizade.

Ao Diogo, por ter sido o primeiro a me apoiar e incentivar a seguir este caminho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa que me foi concedida.

## RESUMO

O algodão é uma das principais commodities da economia brasileira, alavancando o País ao posto de quinto maior produtor mundial. Entre as diferentes pragas da cotonicultura, o bicudo-do-algodoeiro é o inseto-praga mais destrutivo. Pela biotecnologia, um dos métodos alternativos de controle de insetos-praga é o silenciamento gênico, por meio do RNA interferente. Contudo, em insetos, absorção do RNA fita dupla (dsRNA) produzidos por plantas é dificultada, principalmente em decorrência da clivagem do dsRNA na planta e da ação de nucleases presentes no intestino dos insetos. Assim, os objetivos do presente estudo foram estudar o papel de nucleases intestinais de *Anthonomus grandis* na degradação do dsRNA e aumentar a estabilidade das moléculas de dsRNA. Primeiramente, a atividade nucleásica ácida foi detectada no homogenato intestinal de *A. grandis*. Por meio da busca no transcrito de *A. grandis* foram encontradas três *contigs* codificadores de nucleases, denominados *AgNuc1*, *AgNuc2* e *AgNuc3*, cujas sequências foram caracterizadas e validadas por RNAi. As três sequências apresentaram similaridade acima de 50 % em relação às outras nucleases de insetos. A análise por qPCR demonstrou que *AgNuc2* e *AgNuc3* foram altamente expressas no intestino de *A. grandis*. O silenciamento específico de *AgNuc2* culminou na redução da degradação do dsRNA; demonstrando ser a principal nuclease associada à degradação de dsRNA no lúmen intestinal de *A. grandis*. Além disso, visando aumentar a estabilidade do dsRNA, foram desenhados dsRNAs, baseados na arquitetura de viróide, que são resistentes à ação de nucleases. A análise do movimento de dsRNA-viróide marcado com Cy3 no sistema vascular de *Arabidopsis thaliana* demonstrou uma localização celular específica para a estrutura do dsRNA. O dsRNA baseado na arquitetura da família *Pospiviroidae*, foi localizado no núcleo das células, enquanto que o dsRNA, baseado na arquitetura da família *Avsunviroidae*, foi localizado nos cloroplastos das células. Os dsRNAs estabilizados mostraram uma capacidade de silenciamento gênico 8 vezes superior, quando comparado ao dsRNA linear não estruturado. Os dados aqui gerados contribuem para o conhecimento do mecanismo de RNAi em insetos e demonstram que as moléculas de dsRNA

estabilizados apresentam grande potencial para a aplicabilidade da tecnologia do RNAi visando o controle de insetos-praga.

## ABSTRACT

Cotton is one of the most important Brazilian commodities and Brazil is the fifth largest world producer. Nonetheless, productivity is constantly crippled by a variety of agricultural pests. Among the different cotton insect pests, cotton boll weevil is the most destructive. By using biotechnology strategies, one of the alternative methods for controlling crop pests is gene silencing through RNA interference. However, in insects, the absorption of double stranded RNA produced by plants is hampered due to dsRNA cleavage in plants tissues and due to the presence of insect gut nucleases. In this context, the objects of this study were to investigate the dsRNA degradation by *Anthonomus grandis* gut nucleases and improve the stability of dsRNA. Nucleasic activity was detected in *A. grandis* intestinal homogenate. After searching in *A. grandis* transcriptome, three *contigs* codifying nucleases were found, called *AgNuc1*, *AgNuc2* and *AgNuc3*, whose sequences were characterized and validated by RNAi. The three sequences showed similarity above 50% when compared to other insect nucleases. qPCR analysis showed that *AgNuc2* and *AgNuc3* are highly expressed in *A. grandis* midgut. *AgNuc2* gene silencing resulted on reduction of dsRNA degradation; thereby, we concluded that *AgNuc2* is the main nuclease associated with dsRNA degradation in *A. grandis* gut lumen. Additionally, in order to increase dsRNA stability, dsRNA with viroid architecture were designed, wich are resistant to plant nucleases. Viroid-dsRNA were marked with Cy3 and analysed regarding their movement in *A. thaliana* vascular system, wich showed that they are adressed to a specif cellular localization. dsRNA based on *Pospiviroidae* family architecture was located on cell nuclei while dsRNA based on *Avsunviroidae* family was located in chloroplasts. Moreover, these stabilized dsRNAs showed high gene silencing activity, eight times higher than linear dsRNA. The data here generated contribute to our understandings of RNAi mechanisms in insects and show that stabilized dsRNAs exhibit great pontential in RNAi applicability aiming crop insect pest control.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção de algodão no Brasil. ....	23
Figura 2	Países que produzem plantas GM. ....	26
Figura 3	Bicudo do algodoeiro, <i>A. grandis</i> . ....	30
Figura 4	Ciclo de vida do bicudo do algodoeiro, <i>A. grandis</i> . ....	34
Figura 5	Mecanismo do RNAi. ....	38
Figura 6	Mecanismo de amplificação de sinal de RNAi. ....	40
Figura 7	Silenciamento mediado por RNAi em planta transgênica.. ....	45
Figura 8	Aplicações do RNAi no melhoramento de plantas.. ....	47
Figura 9	Intestino de inseto. ....	49
Figura 10	Sintomas associados com a infecção por viróides. ....	51
Figura 10	Estrutura dos viróides das famílias <i>Pospiviroidae</i> e <i>Avsunviroidae</i> .....	52
Figura 11	Classificação dos viróides. Características funcionais e estruturais das famílias <i>Pospiviroidae</i> e <i>Avsunviroidae</i> . ....	52
Figura 12	Mecanismo da replicação por rolamento com os mecanismos assimétrico e simétrico, das famílias <i>Popiviroidae</i> e <i>Avsunviroidae</i> , respectivamente. ....	54
Figura 13	Intestino coletado de <i>A. grandis</i> criado em dieta artificial. ....	59
Figura 14	Microinjeção realizada em inseto adulto de <i>A. grandis</i> . ....	63
Figura 15	Análise da degradação de dsRNA quando incubado com diferentes fontes de nuclease. ....	65
Figura 16	Análise da degradação do dsRNA quando incubado com homogenato intestinal de <i>A. grandis</i> em diferentes. ....	66
Figura 17	Domínio de endonuclease das nucleases identificadas no transcrito de <i>A. grandis</i> .....	67
Figura 18	Análise da sequência peptídica das nucleases encontradas em <i>A. grandis</i> .....	68
Figura 19	Alinhamento das sequências de aminoácidos de nucleases de <i>B. mori</i> , <i>A. grandis</i> , <i>T. castaneum</i> , <i>D. ponderosae</i> , <i>S. gregaria</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>S. marcescens</i> e <i>C. elegans</i> . ....	69
Figura 20	Análise filogenética baseada na sequência de aminoácidos das nucleases de <i>B. mori</i> , <i>A. grandis</i> , <i>T. castaneum</i> , <i>D. ponderosae</i> , <i>S. gregaria</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>S. marcescens</i> e <i>C. elegans</i> . ....	71
Figura 21	Análise por RT-qPCR da expressão tecidual das nucleases de <i>A. grandis</i> . ....	72



Figura22	Análise por RT-qPCR da expressão tecidual das nucleases em diferentes partes do intestino em insetos adultos de <i>A. grandis</i> .....	73
Figura 23	Análise por qRT-PCR do silenciamento gênico das nucleases em <i>A. grandis</i> .....	75
Figura 24	Ensaio de degradação do dsRNA com homogenato intestinal de <i>A. grandis</i> coletado após 72 horas do silenciamento gênico por RNAi das nucleases <i>AgNuc1</i> , <i>AgNuc2</i> e <i>AgNuc3</i> , via microinjeção.....	76
Figura 25	Desenho dos dsRNAs estabilizados por arquitetura de viróide .....	85
Figura 26	Localização subcelular do dsRNA estabilizado por arquitetura de viróide. ....	89
Figura 27	Análise por RT-qPCR da expressão gênica de <i>quitina sintase II</i> em <i>A. grandis</i> após silenciamento gênico, via microinjeção, por dsRNA estabilizado por arquitetura de viróide.....	90

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Cultura de algodão no Brasil por estado.....	24
TABELA 2 - Area plantada de plantas GM por País em 2010.....	26
TABELA 3 - Eventos de algodão GM no Brasil - <i>Gossypium hirsutum</i> L.....	28
TABELA 4 - Silenciamento gênico em insetos por RNAi.....	41
TABELA 5 - Sequências de <i>primers</i> para nucleases.....	63

.

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µL	microlitro
Algodão GM	Algodão Geneticamente Modificado
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
cDNA	DNA complementar
<i>Contigs</i>	Sequências contíguas montadas por alinhamento de reads
Crib3	Com Ribozima 3
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	deoxinucleotídeo
dsRNA	RNA dupla fita
EC	Códigos de classificação enzimática
esiRNA	siRNA preparado enzimaticamente in vitro
EST	expressed sequence tag, etiquetas de transcritos
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
GM	geneticamente modificado
kb	Quilobase - 1000 pares de bases
miRNAs	dsRNA com 21 a 26 nucleotídeos com bases despareadas
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
°C	Graus Celsius
pb	Pares de bases
PCR	Reação de polimerização em cadeia (" <i>polymerase chain reaction</i> ")
PIB	Produto Interno Bruto
<i>Primers</i>	Oligonucleotídeos iniciadores
qRT-PCR	RT-PCR quantitativa (em tempo real)
QS2	<i>Quitina sintase II</i>
RDRP	RNA Polimerase dependente de RNA
RISC	RNA-Induced Silencing Complex

RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA interferente
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
siRNA	dsRNA pequeno com 21 a 26 nucleotídeos com 100% de complementaridade
SRIB1	Sem Ribozima 1
SRIB3	Sem Ribozima 3

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	16
CAPITULO I - REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	20
1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	21
1.1. ALGODÃO .....	21
281-24-236 x 3006-210-23 (MBX-13).....	29
DAS-24236-5 x DAS-21Ø23-5 .....	29
WideStrike™ Cotton .....	29
GHB614 .....	29
1.2. BICUDO-DO-ALGODOEIRO .....	30
1.3. RNA INTERFERENTE .....	35
1.4. RNAi EM PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS .....	44
1.6. VIRÓIDES.....	50
CAPITULO II - SILENCIAMENTO DE NUCLEASES INTESTINAIS DE <i>Anthonomus grandis</i> .....	56
2. INTRODUÇÃO .....	57
3. JUSTIFICATIVA.....	58
4. OBJETIVO GERAL .....	58
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	58
6. METODOLOGIA .....	59
6.1. Insetos .....	59
6.2. Ensaio de digestibilidade de dsRNA com homogenato intestinal de <i>A. grandis</i> .....	59
6.3. Análise da sequência de DNA e proteína utilizando ferramentas de bioinformática .....	60
6.4. Extração de RNA e síntese de cDNA de <i>A. grandis</i> .....	60
6.5. Síntese de dsRNA das nucleases .....	61
6.7. Microinjeção em <i>A. grandis</i> .....	63

6.9. Ensaio de digestibilidade de dsRNA com homogenato intestinal de <i>A. grandis</i> silenciado com 72 horas.....	64
7. RESULTADOS.....	65
7.1. Análise da atividade nucleásica do homogenato intestinal de <i>A. grandis</i> .....	65
7.2. Análise da digestão do dsRNA em pH 5 e pH 7 .....	66
7.3. Identificação de nucleases no transcrito de <i>A. grandis</i> e alinhamento com sequências de nucleases de outros insetos. ....	67
7.4. Análise filogenética .....	70
7.5. Análise da expressão tecidual em <i>A. grandis</i> .....	70
7.6. Análise da expressão das nucleases no intestino de <i>A. grandis</i> .....	73
7.7. Análise do silenciamento das nucleases em <i>A. grandis</i> .....	74
8. DISCUSSÃO .....	77
9. CONCLUSÃO .....	81
CAPITULO III - dsRNA ESTABILIZADO POR ARQUITETURA DE VIROIDE .	82
10. INTRODUÇÃO .....	83
11. JUSTIFICATIVA .....	84
12. OBJETIVO GERAL .....	84
13. OBJETIVO ESPECIFICO .....	84
14. METODOLOGIA .....	85
14.1. Desenho e síntese do dsRNA estabilizado por arquitetura de viróide .	85
14.2. Ensaio de localização celular dos dsRNAs estabilizados, marcados por Cy3, em <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	86
14.3. Microinjeção em <i>A. grandis</i> .....	86
14.4. Determinação do perfil de expressão de QS2 de <i>A. grandis</i> após silenciamento gênico com CRIB3 .....	87
15. RESULTADOS.....	88

15.1. Análise da localização subcelular dos dsRNAs estabilizados, baseados na estrutura de viróide, em Arabidopsis .....	88
15.2. Análise do silenciamento do gene <i>Quitina sintase II</i> pelo dsRNA estabilizado CRIB3 .....	88
16.DISSCUSSÃO.....	91
17. CONCLUSÃO .....	93
18. CONCLUSÃO FINAL .....	94
19.PERSPECTIVAS.....	95
20. BIBLIOGRAFIA .....	96

## INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, a indústria mundial de algodão representa um empreendimento multi multimilionário. O algodão possui um papel importante na economia mundial, pois fornece fibra para a indústria têxtil e de vestuário e sua semente serve como fonte de proteína para óleo vegetal e alimentação (EISA *et al*, 1994). O algodão é cultivado na regiões temperadas e tropicais do globo, em mais de 50 países (SMITH & COTHREN, 1999); entre estes estão incluídos, Estados Unidos, China, Índia, Austrália e Brasil, onde as condições climáticas são favoráveis ao seu crescimento.

O Brasil, segundo o Ministério da Agricultura (MAPA, 2015), é o terceiro maior exportador de algodão do mundo, ultrapassando a produtividade dos Estados Unidos em 60%. Os principais estados que mais produzem algodão no Brasil são o Mato Grosso, Bahia e Goiás, com cerca de 85% da produção nacional (MAPA, 2015). Contudo, na maioria das áreas de produção de algodão, a safra é exposta a uma variedade enorme de insetos-praga e, para manter a qualidade do produto, se desenvolveu uma forte dependência de agrotóxicos. No cenário atual, há uma grande preocupação com o meio ambiente, devido ao uso excessivo de produtos químicos no controle de pragas: além da possibilidade de o inseto desenvolver resistência aos agrotóxicos, inimigos naturais, como predadores e parasitas também acabam sendo eliminados (EISA *et al*, 1994). A presença de mais de mil espécies de insetos em plantações de algodão foi relatada, 30 destas, consideradas pragas (MATTHEWS & TUNSTALL, 1994), incluindo espécies da ordem Coleoptera e Lepdoptera (MENSAH, 1999).

Os insetos da ordem Coleoptera constituem cerca de 40% de todos os insetos, com mais de 350000 espécies descritas (GULLAN & CRANSTON, 2014). Uma das pragas mais importantes, responsáveis pelas perdas na produção de algodão e da qualidade de sua fibra, é o coleóptero *Anthonomus grandis*, popularmente conhecido como bicudo-do-algodoeiro (SANTOS *et al*, 2003). Este inseto-praga é de difícil controle devido ao seu hábito endofítico (RIBEIRO *et al*, 2010). O dano na planta é provocado tanto pelo inseto adulto, quanto pela larva. Os insetos adultos mastigam as maçãs e também se



alimentam de tecidos mais internos. A ovoposição é feita nos orifícios feitos pelo adulto, enquanto se alimenta e as larvas eclodem nas maçãs, fazendo com que estas caiam ou murchem. Este hábito alimentar pode causar a destruição da flor ou a redução do teor de fibra, presente na maçã (HERRNSTADT & SOARES, 1989). Uma geração da planta de algodão dura em torno de 110 a 170 dias, que é o equivalente a 6 gerações de bicudo-do-algodoeiro: uma população de 10 insetos adultos pode produzir, ao final da colheita, até 100 000 outros adultos (BARBOSA *et al*, 1983). Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de novas técnicas para o controle deste inseto-praga, além do uso de agrotóxicos, que são utilizados em grandes quantidades para conseguir controlar as populações astronômicas de bicudo-do-algodoeiro.

Com o avanço nos estudos aplicados à biotecnologia, plantas transgênicas com resistência a insetos-praga e/ou tolerância a herbicidas tem sido geradas. Nos eventos resistentes às pragas, genes que codificam proteínas tóxicas do entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* são inseridos no genoma da planta, pela técnica de engenharia genética. Plantas de algodão transgênicas foram genericamente chamadas de algodoeiros Bt (MOREIRA *et al*, 1999). Atualmente, existem 12 eventos de algodão geneticamente modificados (GM), regulamentados no Brasil, dos 47 disponíveis comercialmente (ISAAA, 2015). Entretanto, nenhum destes eventos é eficaz no controle do bicudo-do-algodoeiro. Nos últimos anos, uma das estratégias aplicadas às plantas transgênicas tem focado na utilização de dsRNA, via RNA interferente, para o silenciamento gênico de moléculas essenciais da praga alvo.

O RNA interferente, primeiramente descoberto em *Caenorhabditis elegans* (FIRE *et al*, 1998), é um mecanismo de regulação gênica pós transcricional, em que moléculas de RNA inibem a expressão de um determinado gene ou pela degradação de seu RNA mensageiro ou pela interrupção de sua tradução. Os efeitos do RNAi se devem pela produção de pequenos RNAs (siRNAs), a partir de longas moléculas de RNA dupla fita (dsRNA), que são clivados por uma enzima chamada DICER, que é uma endonuclease específica para dsRNA. Os siRNAs são incorporados por um complexo enzimático de silenciamento, chamado RISC. Este complexo

enzimático usa a fita guia do siRNA como *template* para reconhecer o RNA mensageiro alvo e promover sua degradação ou interrupção da tradução; a outra fita do siRNA, ou fita passageira, é degradada pelo RISC (MEISTER & TUSCHL, 2004). O RNAi tem sido amplamente usado como uma ferramenta de pesquisa para validar funções de genes; contudo, sua aplicação passou a ter um lado mais comercial, no desenvolvimento de flores com cores específicas, terapêuticos produzidos por plantas e geração de plantas geneticamente modificadas (GM) resistentes a insetos-praga (EAMENS *et al*, 2008). Estudos recentes mostraram que plantas GM produzem siRNAs para se proteger do ataque de insetos-praga (BAUM *et al*, 2007; MAO *et al*, 2007; ZHANG *et al*, 2011). Em um desses relatos, foi feita uma biblioteca de cDNA da lagarta da raiz do milho, *Diabrotica virgifera*, identificando-se 290 genes, com funções biológicas críticas. Um desses genes, para a *V-ATPase A*, mostrou rápido silenciamento gênico, com uma baixa concentração de dsRNA, gerando milho GM expressando dsRNA para *V-ATPase A*, fornecendo significativa proteção contra os danos causados pela lagarta do milho (BAUM *et al*, 2007). Diferentes estudos utilizando a estratégia de silenciamento gênico, por RNAi, vem sendo realizados com insetos-praga, no qual a tecnologia tem se mostrado bastante promissora, como demonstrado com *Tribolium castaneum* (MILLER *et al*, 2008) e *Bombyx mori* (HOSSAIN *et al*, 2008). Um dos métodos de administração do dsRNA nesses estudos é por meio da alimentação; contudo, nucleases presentes no intestino dos insetos degradam o dsRNA, diminuindo ou, até mesmo, inibindo a eficiência de seu papel. (KATOCH & THAKUR, 2012). Além das nucleases intestinais, outro grande problema é a captação do dsRNA pelas células do intestino do inseto e a capacidade de propagação para células adjacentes. Foi demonstrado que o tamanho ideal para que isso ocorra é de cerca de 240 pares de bases (BOLOGNESE *et al*, 2012). A planta transformada pela estratégia de RNAi será um constante fornecedor de dsRNA, porém este necessita ser expresso de forma estável na planta, a fim de que seja assimilado da maneira correta pelo inseto; ou seja, o inseto deve assimilar o dsRNA longo, não processado pela DICER pela planta.

Uma das maneiras de estabilizar o dsRNA é por meio de estruturas secundárias inspiradas na arquitetura de viróides. Viróides são considerados os

menores agentes infecciosos, não possuindo proteínas em sua estrutura; também não as codificam para desempenhar funções específicas, além de possuírem RNA circular como material genético. Há duas famílias de viróides conhecidas: *Pospiviroidae* e *Avsunviroidae*. A primeira possui estruturas secundárias altamente ramificadas no RNA, replicam nos cloroplastos e possuem ribozima, ou seja, RNA com atividade acatalítica (FLORES *et al*, 2014); a segunda família se replica no núcleo e não possui ribozima (DING & WANG, 2009). Uma das vantagens de se utilizar viróides para estabilizar a estrutura do dsRNA é que estes infectam apenas plantas superiores, sendo totalmente dependentes da célula hospedeira para completar as etapas de seu ciclo infeccioso (SANO *et al*, 2010).

Sendo assim, as nucleases intestinais do bicudo-do-algodoeiro são potenciais alvos para o silenciamento gênico, visando uma melhor administração do dsRNA ao inseto, pela planta, sem que este seja degradado. Além disso, a estabilização da estrutura do dsRNA por meio da arquitetura de viróide pode levar à maior eficiência da administração do dsRNA da planta ao inseto.

## 18. CONCLUSÃO FINAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade de estruturas de dsRNA visando o silenciamento gênico para o controle de insetos-praga por meio do RNAi. A estabilidade do dsRNA foi avaliada tanto na planta, quanto no inseto. O dsRNA baseado na estrutura de viróide se manteve estável na planta, permanecendo imune à maquinaria do RNAi e armazenando-se nos compartimentos subcelulares a que foram endereçados; no caso, núcleo e cloroplastos. Entretanto, apesar de serem capazes de causar silenciamento gênico via microinjeção, essas estruturas não se mostraram estáveis quando colocadas em contato com o homogenato intestinal do bicudo-do-algodoeiro, ocorrendo sua degradação por conta da presença de nucleases no intestino do inseto. A inibição das nucleases intestinais do bicudo, mais especificamente de *AgNuc2*, é uma alternativa para resultados mais positivos em relação ao silenciamento gênico em *A. grandis* pela administração do dsRNA via oral. Pelo silenciamento dos genes das nucleases, via microinjeção, pode-se perceber uma diminuição significativa da degradação do dsRNA.

Baseado nos dados gerados nos diferentes capítulos, aqui apresentados, pode-se concluir que a tecnologia de RNAi no controle do inseto-praga, *A. grandis*, poderá ser aplicada e ser mais eficiente com o uso associado de moléculas mais estabilizadas baseadas em estruturas virais, silenciamento simultâneo de nucleases e de moléculas essenciais.

A continuidade deste estudo será desenvolver estratégias de proteção do dsRNA contra as nucleases presentes no intestino de *A. grandis*.

## 19.PERSPECTIVAS

Este trabalho gerou perspectivas de melhorar a estabilidade do dsRNA no inseto-alvo. A estabilização do dsRNA pode ser por meio da inibição das nucleases, presentes no intestino de *A. grandis*, por meio de peptídeos e/ou anticorpos. Além disso, o dsRNA pode ser protegido da degradação por essas nucleases intestinais, por meio de peptídeos que se liguem a ele, evitando que este seja degradado no intestino do inseto.

## 20. BIBLIOGRAFIA

ABDEL-IATIF, M.; HOFFMANN, K. H. Functional activity of allatotropin and allatostatin in the pupal stage of a holometabolous insect, *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Peptides*. 2013.

ABRAPA. Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Disponível em <<http://www.abrapa.com.br/>>. Acesso em 02/02/2015.

AGRAWAL, N.; DASARADHI, P. V. N.; MOHMMED, A.; MALHOTA, P.; BHATNAGAR, R. K.; MUKHERJEE, S. K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Volume 67, número 4, 657-685, 2003.

AGRAWAL, N.; SACHDEV, B.; RODRIGUES, J.; SREE, K. S.; BHATNAGAR, R. K. Development associated profiling of chitinase and microRNA of *Helicoverpa armigera* identified chitinase repressive microRNA. *Scientific Reports*. Volume 3, número 2292, 1-6, 2013.

ALI, N.; DATTA, S. K.; DATTA, K. RNA interference in designing transgenic crops. *GM Crops*. Volume 1, número 4, 207-213, 2014.

ARIMATSU, Y.; KOTANI, E.; SUGIMURA, Y.; FURUSAWA, T. Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bomby mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Volume 37, 176-183, 2007.

BACHMAN, P. M.; BOLOGNESI, R.; MOAR, W. J.; MUELLER, G. M.; PARADISE, M. S.; RAMASESHADRI, P.; TAN, J.; UFFMAN, J. P.; WARRE, J.; WIGGINS, E.; LEVINE, S. L. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Transgenic Research*, Volume 22, 1207-1222, 2013.

BANSAL, R.; MICHEL, A. P. Core machinery and Sid1, a component for systemic RNAi in the Hemipteran insect, *Aphis glycines*. *International Journal of Molecular Sciences*. Volume 14, 3786-3801, 2013.

BARBOSA, S.; BRAGA SOBRINHO, R.; LUKEFAHR, M. J.; BEINGOLEA, G. O. Relatório sobre a ocorrência do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* Boheman, Boll Weevil, no Brasil, e recomendações para a sua erradicação. Campina Grande:Embrapa-CNPA, 1983.

BARFOOT, P.; BROOKES, G. Key global environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996-2012. GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain, Volume 5, 149-160, 2014.

BASTOS, C. S.; PEREIRA, M. J. B.; TAKIZAWA, E. K.; OHI, G.; AQUINO, V. R. Bicudo do algodoeiro: identificação, biologia, amostragem e táticas de controle. Circular Técnica. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Campina Grande, PB, 2005.

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. Volume 25, número 11, 1322 - 1326, 2007.

BLAISE, D.; SINGH, J. V.; BONDE, A. N.; TEKALE, K. U.; MAYEE, C. D. Effects of farmyard manure and fertilizers on yield, fibre quality and nutrient balance of rainfed cotton (*Gossypium hirsutum*). Biosource Technology. Volume 96, 345 - 349, 2005.

BOLOGNESI, R.; RAMASESHADRI, P.; ANDERSON, J.; BACHMAN, P.; CLINTON, W.; FLANNAGAN, R.; ILAGAN, O.; LAWRENCE, C.; LEVINE, S.; MOAR, W.; MUELLER, G.; TAN, J.; UFFMAN, J.; WIGGINS, E.; HECK, G.; SEGERS, G. Characterizing the Mechanism of Action of Double-Stranded RNA activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). Plos One. Volume 7, 2012.

BUCHON, N.; VAURY, C. RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements. Heredity. Volume 96, 195 - 202, 2006.

BURAND, J. P.; HUNTER, W. B. RNAi: Future in insect management. Journal of Invertebrate Pathology. Volume 12, 68 - 74, 2013.

- BUSOLI, A. C.; PEREIRA, F. F.; LOPÉZ, V. A. G.; SOARES, J. J.; MELO, R. S.; ALMEIDA, C. A. Preferência alimentar do bicudo-do-algodoeiro por frutos de diferentes cultivares e idades. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Volume 39, número 2, 101-104, 2004.
- CHAPMAN, R. F. *The insects: structure and function*. 5th edn. (eds. S. J. Simpson & A.E. Douglas), Cambridge University Press, Cambridge. 2013.
- CHEN, X. MicroRNA biogenesis and function in plants. *Federation of European Biochemical Societies*. Volume 579, 5923-5931, 2005.
- CHU, C.-C.; SUN, W.; SPENCER, J. L.; PITTENDRIGH, B. R.; SEUFFERHELD, M. J. Differential effects of RNAi treatments on field populations of the western corn rootworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Volume 110, 1-6, 2014.
- CROSS, W. H. Biology, control, and eradication of the boll weevil. *Annual Review of Entomology*. Volume 18, 17-46, 1973.
- DEIST, B. R.; RAUSH, M. A.; FERNANDEZ-LUNA, M. T.; ADANG, M. J.; BONNING, B. C. Bt toxin modification for enhanced efficacy. *Toxins*. Volume 6, 3005-3027, 2014.
- DENG, Y.; WANG, C. C.; CHOY, K. W.; DU, Q.; CHEN, J.; WANG, Q., LI, L.; CHUNG, T. K. H.; TANG, T. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies. *Gene*. Volume 538, 217-227, 2014.
- DIENER, T. O. Viroid processing: a model involving the central conserved region and *hairpin* I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Volume 83, 58-62, 1986.
- DI SERIO, F.; FLORES, R. Viroids: molecular implements for dissecting RNA trafficking in plants. *RNA Biology*. Volume 5, número 3, 128-131, 2008.
- DING, B.; KWON, M. O.; HAMMOND, R.; OWENS, R. Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *The Plant Journal*. Volume 12, número 4, 931-936, 1997.



DING, B. The biology of viroid-host interactions. Annual Review of Phytopathology. Volume 47, 105-131, 2009.

DING, B.; WANG, Y. Viroids: uniquely simple and tractable models to elucidate regulation of cell-to-cell trafficking of RNA. DNA and Cell Biology. Volume 28, Número 2, 51-56, 2009.

DOGINI, D. B.; PASCOAL, V. D. B.; AVANSINI, S. H.; VIEIRA, A. S.; PEREIRA, T. C.; LOPES-CENDES, I. The new world of RNAs. Genetics and Molecular Biology. Volume 37, número 1, 285-293, 2014.

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.

EISA, H. M.; BARGHOUTI, S.; GILLHAM, F.; AL-SAFFY, M. T. Cotton production prospects for the decade to 2005. World Bank Technical Paper Número 231, 1994.

ESTRUCH, J. J.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; DUCK, N. B.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G. Transgenic plants: An emerging approach to pest control. Nature. Volume 15, 137-141, 1997.

FAEHNLE, C. R.; JOSHUA-TOR, L. Argonautes confront new small RNAs. Current Opinion in Chemical Biology. Volume 11, número 5, 569-577, 2007.

FARIAS, F. J. C.; LUKEFAHR, M. J.; COSTA, J. N.; FREIRE, E. C. Comportamento de progênies oriundas de raças primitivas de algodão herbáceo frente ao ataque do bicudo. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, volume 34, número 12, 2235-2240, 1999.

FEINBERG, E. H.; HUNTER, C. P. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. Science. Volume 301, 1545-1547, 2003.

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. Volume 391, 806-811, 1998.

FLORES, R.; RANDLES, J. W.; BAR-JOSEPH, M.; DIENER, T. O. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of Virology*. Volume 143, número 3, 623-630, 1998.

FLORES, R.; GAS, M.-E.; MOLINA-SERRANO, D.; NOHALES, M.-A.; CARBONELL, A.; GAGO, S.; DE LA PEÑA, M.; DAROS, J.-A. Viroid replication: rolling-circles, enzymes and ribozymes. *Viruses*. Volume 1, 317-334, 2009.

FLORES, R.; GAGO-ZACHERT, S.; SERRA, P.; SANJUÁN, R.; ELENA S. F. Viroids: Survivors from the RNA world? *Annual Review of Microbiology*. Volume 68, 395 - 414, 2014.

FIRMINO, A. A. P. Análise do transcrito de *Anthonomus grandis* e avaliação de um gene com potencial aplicação para controle do inseto por silenciamento gênico. 2012.

FIRMINO, A. A. P.; FONSECA, F. C. A.; MACEDO, L. L. P.; COELHO, R. R.; SOUZA JR, J. D. A.; TOGAWA, R. C.; SILVA-JUNIOR, O. B.; PAPPAS-JR, G. J.; SILVA, M. C. M.; ENGLER, G.; GROSSI-DE-SA, M. F. Transcriptome analysis in Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA interference in insect pests. *Plos One*. Volume 8, 1 - 15, 2013.

FÔRSTEMANN, K.; TOMARI, Y.; DU, T.; VAGIN, V. V.; DENLI, A. M.; BRATU, D. P.; KLATTENHOFF, C.; THEURKAUF, W. E.; ZAMORE, P. D. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *Plos One*. Volume 3, 1187-1201, 2005.

FRIEDHOFF, P.; Gimadutdinow, O.; Pingoud, A. Identification of catalytically relevant amino acids of the extracellular *Serratia marcescens* endonuclease by alignment-guided mutagenesis. *Nucleic Acid Research*. Volume 22, número 16, 3280-3287, 1994.

FRYXELL, P. A. A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (*Malvaceae*) *Rheedea*. Volume 2, 108-165, 1987.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. L.; BATISTA, G. D.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. P.; ZUCCHI, R.; ALVES, S.; VENDRAMIM,

J., Manual de entomologia agrícola. Editora Agronômica “Ceres” Ltda, v., n. p. 1988.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. Entomologia Agrícola. Piracicaba: Fealq, 920p, 2002.

GASSMANN, A. J.; HUTCHISON, W. D. Bt crops and insect pests: Past successes, future challenges and opportunities. GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain. Volume 3, 139-139, 2012.

GÓMEZ, G.; PALLÁS, V. Viroids; a light in the darkness of the *lncRNA*-directed regulatory networks in plants. New Phytologist. Volume 198, 10-15, 2013.

GONDIM, D. M. C.; BELOT, J.-L., SILVIE, P.; N. PETIT. Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais do algodoeiro no Brasil. Boletim Técnico, número 33, 2001.

GONG, Y.-H.; YU, X.-R.; SHANG, Q.-L.; SHI, X.-Y.; GAO, X.-W. Oral delivery mediated RNA interference of a carboxylesterase gene results in reduced resistance to organophosphorus insecticides in the cotton aphid, *Aphis gossypii* glover. Plos One. Volume 9, número 8, 1-9, 2014.

GÓRA-SOCHACKA, A. Viroids: unusual small pathogenic RNAs. Acta Biochimica Polonica. Volume 51, número 3, 587-607, 2004.

GREENBERG, S. M.; SAPPINGTON, T. W.; ADAMCZYK, J. J.; LIU, T.-X.; SETAMOU, M. Effects of Photoperiod on Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae) Development, survival and reproduction. Physiological Ecology. Volume 37, número 6, 1396-1402, 2008.

GRIGOLLI, J. F. J. Comportamento alimentar e distribuição vertical de botões florais atacados por *Anthonomus grandis* Boh. em cultivares de algodoeiro. 2012.

GROSS, B. L.; STRASBURG, J. Cotton domestication: dramatic changes in a single cell. BioMed Central Biology. Volume 8, 137-139, 2010.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. The insects: an outline of entomology. Quinta edição. Oxford, Reino Unido, John Wiley & Sons, Ltd, 2014.

HAMMANN, C.; STEGER, G. Viroid-specific small RNA in plant disease. RNA Biology. Volume 9, número 6, 809-819, 2012.

HAMMANN, C.; LUPTAK, A.; PERREAULT, J.; DE LA PEÑA, M. The ubiquitous hammerhead ribozyme. RNA Journal. Volume 18, 871-885, 2012.

HAN, P.; FAN, J.; LIU, Y.; CUTHBERTSON, A. G. S.; YAN, S.; QIU, B.-L.; REN, S. RNAi-mediated knockdown of serine protease inhibitor genes increases the mortality of *Plutella xylostella* challenged by Destruxin A. Plos One. Volume 9, número 5, 1-16, 2014.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J., qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. Genome Biology. Volume 8, número 2, 2007.

HERRNSTADT, C.; SOARES, G. G. Cotton boll weevil, alfalfa weevil, and corn rootworm via contact with a strain of *Bacillus thuringiensis*. United States Patent. Patent número 4.797.276, 1989.

HOSSAIN, M.; SAKIKO, S.; MASAHIKO, M.; MASANORI, I.; SHO, S. MASAFUMI, I. Expression of 20-hydroxyecdysone-induced genes in the silkworm brain and their functional analysis in post-embryonic development. Insect Biochemistry and Molecular Biology. Volume 38, 1001–1007, 2008.

HUTVAGNER, G. Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. Federation of European Biochemical Societies. Volume 579, 5850-5857, 2005.

ISAAA. GM Aproval Database. Disponível em <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp> Acesso em: 02.02.2015.

ITAYA, A.; MATSUDA, Y.; GONZALES, R. A.; NELSON, R. S.; DING, B. Potato spindle tuber viroid strains of different pathogenicity induces and suppresses

expression of common and unique genes in infected tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. Volume 15, número 10, 990-999, 2002.

JAGTAP, U. B.; GURAV, R. G.; BAPAT, V. A. Role of RNA interference in plant improvement. *Naturwissenschaften*. Volume 98, 473-492, 2011.

JAYASENA, V. K.; GOLD, L. In vitro selection of self-cleaving RNAs with a low pH optimum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Volume 94, 10612-10617, 1997.

JENKINS, J. N. Cotton. In: *Traditional crop breeding practices: an historical review to serve as a baseline for assessing the role of modern biotechnology*. OECD, 61-70, 2003.

JIN, L.; WEI, Y.; ZHANG, L.; YANG, Y.; TABASHNICK, B. E.; WU, Y. Dominant resistance to Bt cotton and minor cross-resistance do Bt toxin Cry2Ab in cotton bollworm from China. *Evolutionary Applications*. Volume 6, 1222-1235, 2013.

KATOCH, R.; THAKUR, N. Insect Gut Nucleases: a Challenge for RNA interference mediated insect control strategies. *International Journal of Biochemistry and Biotechnology*. Volume 1, 198 - 203, 2012.

KATOCH, R.; SETHI, A.; THAKUR, N.; MURDOCK, L. L. RNAi for Insect Control: Current Perspective and Future Challenges. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Volume 171, 847 - 873, 2013.

KIAWU, J.; VALDES, C.; MACDONALD, S. *Brazil's Cotton Industry: Economic Reform and Development*. United States Department of Agriculture, 2011.

KIM, K. S.; SZENDREI, Z.; RODRIGUEZ-SAONA, C.; MULDER JR., P. G.; SAPPINGTON, T. W. Molecular diagnostic for boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) based on amplification of three species-specific microsatellites. *Molecular Entomology*. Volume 102, número 2, 759-766, 2009.

KOBAYASHI, I.; TSUKIOKA, H.; KÔMOTO, N.; UCHINO, K.; SEZUTSU, H.; TAMURA, T.; KUSAKABE, T.; TOMITA, S. SID-1 protein of *Caenorhabditis elegans* mediates uptake of dsRNA into *Bombyx* cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Volume 42, 148 - 154, 2012.

KOCH, A.; KOGEL, K.-H. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnology Journal*. Volume 12, 821-831, 2014.

KOVALSKAYA, N.; HAMMOND, R. W. Molecular biology of viroid-host interaction and disease control strategies. *Plant Science*. Volume 228, 48-60, 2014.

LANGE, F.; OLMSTEAD, A. L.; RHODE, P. W. The impact of the Boll Weevil, 1892-1932. *The Journal of Economic History*. Volume 69, número 3, 685-718, 2009.

LASDA, E.; PARKER, R. Circular RNAs: diversity of form and function. *RNA Journal*. Volume 20, número, 12, 1829-1842, 2014.

LINS JR., JURACY CALDEIRA; NASCIMENTO, M. L.; MENEZES, A. M. S.; RODRIGUES, I. J. S.; LIMA, E. S. A.; DIAS, T. K. R.; DIAS, P.C.; CARDOSO, U. P.; SÃO JOSÉ, A. R. Controle alternativo do bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Brasileira de Agroecologia*. Volume 2, número 2, 987-990, 2007.

LIU, Y.; TABASHNIK, B. E., DENNEHY, T. J.; PATIN, A. L.; BARTLETT, A. C. Development time and resistance to Bt crops. *Nature*. Volume 400, 519-519, 1999.

LIU, S.; LUCAS, K. J.; ROY, S.; HA, J.; RAIKHEL, A. S. Mosquito-specific microRNA-1174 targets serine hydroxymethyltransferase to control key functions in the gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Volume 111, número 40, 14460-14465, 2014.

LIU, F.; WANG, X.-D.; ZHAO, Y.-Y.; LI, Y.-J.; LIU, Y.-C.; SUN, J. Silencing the HaAK gene by transgenic plant-mediated RNAi impairs larval growth of *Helicoverpa armigera*. *International Journal of Biological Sciences*. Volume 11, 67-74, 2015.

LLOYD, E. P.; BARBOSA, S.; LUKEFAHR, M. J.; BRAGA SOBRINHO, R. B. Ecologia do bicudo do algodoeiro. Brasília, EMBRAPA-DDT, 135-144, 1986.

MACEDO, L. L. P. Silenciamento gênico de quitina sintases de *Anthonomus grandis*: potencial biotecnológico no controle de insetos-praga. 2012.

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. Nat Biotechnol, Volume 25, número 11, 1307-1313, 2007.

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

MAPA. Ministério da Agricultura. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/algodao>>. Acesso em: 02.02.2015.

MATTHEWS, G. A.; TUNSTALL, J. P. Insect pests of cotton. Wallingford: Cab International, 1994.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature. Volume 431, 343-349, 2004.

MENSAH, R. K. Habitat diversity: implications for the conservation and use of predatory insects of *Helicoverpa* spp. in cotton systems in Australia. International Journal of Pest Management. Volume 45. 1999.

MILLER, S. C.; BROWN, S. J.; TOMOYASU, Y. Larval RNAi in *rosophila*? Development Genes and Evolution. Volume 218, 505-510, 2008.

MILLER, S. C.; MIYATA, K.; BROWN, S. J.; TOMOYASU, Y. Dissecting Systemic RNA Interference in the Red Flour Beetle *Tribolium castaneum*: Parameters Affecting the Efficiency of RNAi. Plos One. Volume 7, 1 - 14, 2012.

MON, H.; LI, Z.; KOBAYASHI, I.; TOMITA, S.; LEE, J.; SEZUTSU, H.; TAMURA, T.; KUSAKABE, T. Soaking RNAi in *Bombyx mori* BmN4-SID1 cells arrests cell cycle progression. Journal of Insect Science. Volume 13, número 155, 1-7, 2013.

- MONNERAT, R. G.; NOBRE, S. D. N.; OLIVEIRA NETO, O. B.; SCHMIDT, F. G. V.; DIAS, S.; LAUMAN, R.; GROSSI DE SÁ, M. F.; SUJII, E. R. Parâmetros bionômicos do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) criado em dieta artificial para a realização de bioensaios. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa, Brasília, DF. Número 29, 2002.
- MOREIRA, J. D. A. N.; HOFFMANN, L. V.; LIMA, M. M. D. A.; NÓBREGA, M. B. D. M.; VIDAL, M. S.; VIEIRA, R. D. M.; BARROSO, P. A. V., Transgenia em algodoeiro. In O Agronegócio do Algodão no Brasil, Beltrão, N. E. M., Ed. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, DF, Vol. 2, pp 453-480. 1999.
- NISHIDA, K. M.; MIYOSHI, K.; OGINO, A.; MIYOSHI, Y.; SIOMI, H.; SIOMI, M. C. Roles of R2D2, a cytoplasmic D2 body component, in the endogenous siRNA pathway in *Drosophila*. *Molecular Cell*. Volume 49, 680-691, 2013.
- NOHALES, M.-A.; FLORES, R.; DAROS, J.-A. Viroid RNA redirects host DNA ligase 1 to act as an RNA ligase. *PNAS*. Volume 109, número 34, 13805-13810, 2012.
- OLIVEIRA, G. R.; SILVA, M. C. M.; LUCENA, W. A.; NAKASU, E. Y. T.; FIRMINO, A. A. P.; BENEVENTI, M. A.; SOUZA, D. S. L.; GOMES JR, J. E.; SOUZA JR, J. D. A.; RIGDEN, D. J.; RAMOS, H. B.; SOCCOL, C. R., GROSSI-DE-SÁ, M. F. Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *BMC Biotechnology*. Volume 11, 1-13, 2011.
- OERKE, E.-C. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*. Volume 144, 31-43, 2006.
- ONGVARRASOPONE, C.; ROSHORM, Y.; PANYIM, S. A Simple and Cost Effective Method to Generate dsRNA for RNAi Studies in Invertebrates. *Science Asia*. Volume 33, 35 - 39, 2006.
- OWENS, R. A.; BLACKBURN, M.; DING, B. Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. Volume 14, número 7, 905-909, 2001.
- OWENS, R. A.; HAMMOND, R. W. Viroid pathogenicity: one process, many faces. *Viruses*. Volume 1, número 2, 298-316, 2009.



PALAUTAKIS, P. Potato spindle tuber viroid: investigation of the long-distance, intra-plant transport route. *Virology*. Volume 158, 239-241, 1987.

PALAUTAKIS, P. What has been happening with viroids? *Virus Genes*. Volume 49, 175-184, 2014.

PATERSON, A. H. Genetics and Genomic of Cotton. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*. Springer Science. Volume 3, 2009.

PERKINS, J. H. Boll Weevil Eradication. *Science*. Volume 207, número 7, 1044-1050, 1980.

PERLAK, F. J.; OPPENHUIZEN, M.; GUSTAFSON, K.; VOTH, R.; SIVASUPRAMANIAM, S.; HEERING, D.; CAREY, B.; IHRIG, R. A.; ROBERTS, J. K. Development and commercial use of Bollgard cotton in the USA - early promises versus today's reality. *The Plant Journal*. Volume 27, 489-501, 2001.

PICKERSGILL, B. Domestication of plants in the Americas: insights from Mendelian and molecular Genetics. *Annals of Botany*. Volume 100, 925-940, 2007.

PRAÇA, L. B.; CONCEIÇÃO, R.; SANTOS, W. J.; MONNERAT, R. G. *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae) Descrição, monitoramento, controle e estratégias de convivência com o bicudo do algodoeiro. *Comunicado Técnico* 157, 2007.

PRENTICE, K.; PERTRY, I.; CHRISTIAENS, O.; BAUTERS, L.; BAILEY, A.; NIBLETT, C.; GHISLAIN, M.; GHEYSEN, G.; SMAGGHE, G. Transcriptome analysis and systemic RNAi response in the african sweet potato weevil (*Cylas puncticollis*, Coleoptera, Brentidae). *Plos One*. 1-18, 2015.

PRICE, R. G.; GATEHOUSE, J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. *Cell*. Volume 26, número 7, 393-400, 2008.

PRIVALLE, L. S. Development of an Agricultural Biotechnology Crop Product: Testing from Discovery to Commercialization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume 60, 10179-10187, 2012.

RAMALHO, F. S.; GONZAGA, J. V.; SILVA, J. R. B. Método para determinação das causas de mortalidade natural do bicudo-do-algodoeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, volume 28, número 8, 877-887, 1993.

RAMASESHADRI, P.; SEGERS, G.; FLANNAGAN, R.; WIGGINS, E.; CLINTON, W.; ILAGAN, O.; MCNULTY, B.; CLARK, T.; BOLOGNESI, R. Physiological and cellular responses caused by RNAi-mediated suppression of *Snf7* orthologue in Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) larvae. Plos One. Volume 8, número 1, 1-10, 2013.

RAMASWAMY, G.; SLACK, F. J. siRNA: a guide for RNA silencing. Chemistry & Biology. Volume 9, 1053-1057, 2002.

REN, D.; CAI, Z.; SONG, J.; WU, Z.; ZHOU, S. dsRNA uptake and persistence account for tissue-dependent susceptibility to RNA interference in the migratory locust, *Locusta migratoria*. Insect Molecular Biology. 1-10, 2013.

RIBEIRO, P. A.; SUJII, E. R.; DINIZ, I. R.; MEDEIROS, M. A.; SALGADO-LABOURIAU, M. L.; BRANCO, M. C.; PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G. Alternative food sources and overwintering feeding behavior of the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) under the tropical conditions of central Brazil. Ecology, Behavior and Bionomics. Volume 39, 28 - 34, 2010.

RUNO, S.; ALAKONYA, A.; MACHUKA, J.; SINHA, N. RNA interference as a resistance mechanism against crop parasites in Africa: a 'Trojan horse' approach. Pest Management Science. Volume 67, número 2, 129-136, 2011.

SANO, T.; BARBA, M.; S.-F., LI; HADIDI, A. Viroids and RNA silencing: mechanism, role in viroid pathogenicity and development of viroid-resistant plants. GM Crops. Volume 1, número 2, 80-86, 2010.

SANTOS, W. J. Monitoramento e controle das pragas do algodoeiro. Cultura do algodoeiro. Potafos. Piracicaba. 133-179, 1999.

SANTOS, R. C.; MARCELLINO, L. H.; MONNERAT, R. G.; GANDER, E. S. Mechanical damage in cotton buds caused by the boll weevil. Pesq. qgropec. bras., Brasília, volume38, 1351-1356, 2003.

SANTOS, C. L. Tecnologias atuais e potenciais de controle do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Boh., 1843) relacionadas ao plano de manejo do Parque Nacional das Emas. 2010.

SAPPINGTON, T. W.; SPURGEON, D. W. Preferred technique for adult sex determination of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America*. Volume 93, número 3, 610-615, 2000.

SAURABH, S.; VIDYARTHI, A. S.; PRASAD, D. RNA interference: concept to reality in crop improvement. *Planta*. Volume 239, 543-564, 2014.

SCHELL, J. Cotton carrying the recombinant insect poison Bt toxin: no case to doubt the benefits of plant biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. Volume 8, 235-236, 1997.

SCHNEPF, R. D.; DOHLMAN, E.; BOLLING, C. Agriculture in Brazil and Argentina: Developments and Prospects for Major Field Crops. *Agriculture and Trade Report*. Número 85, 2001.

SCOTT, J. G.; MICHEL, K.; BARTHOLOMAY, L. C.; SIEGFRIED, B. D.; HUNTER, W. B.; SMAGGHE, G.; ZHU, K. Y.; DOUGLAS, A. E. Towards the Elements of Successful Insect RNAi. *Journal of Insect Physiology*. Volume 59, 1212 - 1221, 2013.

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

SINGH, A. D.; WONG, S.; RYAN, C. P.; WHYARD, S. Oral delivery of double-stranded RNA in larvae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: implications for pest mosquito control. *Journal of Insect Science*. Volume 13, número 69, 1-18, 2013.

SNEAD, N. M.; WU, X.; LI, A.; CUI, Q.; SAKURAI, K.; BURNETT, J. C.; ROSSI, J. J. Molecular basis for improved gene silencing by Dicer substrate interfering RNA compared with other siRNA variants. *Nucleic Acid Research*. Volume 41, número 12, 6209-6221, 2013.

SMITH, W. C.; COTHREN, J. T. Cotton: Origin, History, Technology and Production. Production statistics. 1999.

SPURGEON, D. W.; SAPPINGTON, T. W.; SUH, C. P.-C. A system for characterizing reproductive and diapause morphology in the boll weevil (Coleoptera; Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America*. Volume 96, número 1, 1-11, 2003.

SUZUKI, M. G.; ITO, H.; AOKI, F. Effects of RNAi-mediated knockdown of histone methyltransferases on the sex-specific mRNA expression of *Imp* in the silkworm *Bombyx mori*. *International Journal of Molecular Sciences*. Volume 15, 6772-6796, 2014.

TABASHNIK, B. E., VAN RENSBURG, J. B. J.; CARRIÈRE, Y. Field-Evolved Insect Resistance to Bt Crops: Definition, Theory, and Data. *Journal of Economic Entomology*. Volume 102, 2011 - 2025, 2009.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Volume 109B, número 1, 1-62, 1994.

TERRA, W. T. The origin and functions of the insect peritrophic mebrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. Volume 47, 47-61, 2001.

TIJSTERMAN, M.; PLASTERK, R. H. A. Dicers at RISC: the mechanism of RNAi. *Cell*. Volume 117, 1-4, 2004.

TOMOYASU, Y.; MILLER, S. C.; TOMITA, S.; SCHOPPMEIER, M.; GROSSMANN, D.; BUCHER, G. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology*. Volume 9, número 1, 2008.

TSAGRIS, E. M.; ALBA, A. E. M.; GOZMANOVA, M.; KALANTIDIS, K. Viroids. *Cellular Microbiology*. Volume 10, número 11, 2168-2179, 2008.

WANG, C.; YIN, X.; KONG, X.; LI, W.; MA, L.; SUN, X.; GUAN, Y.; TODD, C. D.; YANG, Y.; HU, X. A series of TA-based and zero-background vectors for plant functional genomics. *Plos One*. Volume 8, número 3, 1-10, 2013.

WASSENEGGER, M. The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell*. Volume 122, 13-16, 2005.

WENDEL, J. F.; BRUBAKER, C.; ALVAREZ, I.; CRONN, R.; STEWART, J. McD. Evolution and natural history of the cotton genus. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*. Volume 3, 3-22, 2009.

WU, K. M.; GUO, Y. Y. The evolution of cotton pest management practices in China. *Annual Review of Entomology*. Volume 50, 491-498, 2005.

WYNWAT, N.; SANTOS, D.; VERDONCK, R.; SPIT, J.; WIELENDAELE, V.; BROECK, J. V. Identification, functional characterization and phylogenetic analysis of double stranded RNA degrading enzymes present in the gut of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Volume 46, 1-8, 2014.

WYNANT, N.; SANTOS, D.; WIELENDAELE, P. V.; BROECK, J. V. Scavenger receptor-mediated endocytosis facilitates RNA interference in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Molecular Biology*. Volume 23, número 3, 320-329, 2014.

XIAO, D.; LIANG, X.; GAO, X.; YAO, J.; ZHU, K. Y. The *lethal giant larvae* gene in *Tribolium castaneum*: molecular properties and roles in larval and pupal development as revealed by RNA interference. *International Journal of Molecular Sciences*. Volume 15, 6880-6896, 2014.

YU, J.; JUNG, S.; CHENG, C.; FICKLIN, S. P.; LEE, T.; ZHENG, P.; JONES, D.; PERCY, R. G.; MAIN, D. CottonGen: a genomics, genetics and breeding database for cotton research. *Nucleic Acids Research*, 1-8, 2013.

ZHANG, H.; YIN, W.; ZHAO, J.; JIN, L.; YANG, Y.; WU, S.; TABASHNIK, B. E.; WU, Y. Early warning of Cotton Bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China. *Plos One*. Volume 6, 1-8, 2011.

ZHANG, S.; LIU, Y.; YU, B. PRL1, an RNA-binding protein, positively regulates the accumulation of miRNAs and siRNAs in Arabidopsis. Plos Genetics. Volume 10, número 12, 1-9, 2014.

ZHONG, X.; ARCHUAL, A. J.; AMIN, A. A.; DING, B. A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. The Plant Cell. Volume 20, 35-47, 2008.

ZHU, Y.; GREEN, L.; WOO, Y.-M.; OWENS, R.; DING, B. Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. Virology. Volume 279, 69-77, 2001.