



Universidade de Brasília - UnB

Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular

Hudson Fernando Nunes Moura

Transcritoma de *Helicoverpa Armigera* (Lepidoptera: noctuidae); Interação com
Hospedeiros e Identificação de Alvos Biotecnológicos p/ o controle

Brasília-DF

2019

HUDSON FERNANDO NUNES MOURA

Transcritoma de *Helicoverpa Armigera* (Lepidoptera: noctuidae); Interação com Hospedeiros e Identificação de Alvos Biotecnológicos p/ o controle

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Orientador (a): Dra. Maria Fátima Grossi de Sá

Coorientadores: Dr. José Dijair Antonino de Souza Junior e Dra. Roberta Ramos Coelho

Brasília-DF

2019

Esta Tese intitulada “Transcritoma de Helicoverpa Armigera (Lepidoptera: noctuidae); Interação com Hospedeiros e Identificação de Alvos Biotecnológicos p/ o controle” foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Molecular e avaliado pela banca examinadora abaixo assinada.

Hudson Fernando Nunes Moura

Tese avaliada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria Fátima Grossi de Sá (Presidente)
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular – UnB

Dra. Carolina Vianna Morgante
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Osmundo Brilhante de Oliveira Neto
Centro Universitário Unieuro/Embrapa Cenargen

Dr. Robert Neil Gerard Miller
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular – UnB

Dr. Leonardo Lima Pepino de Macêdo
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, em quem acredito piamente, pelo dom da vida, pela clareza da fé e por tantas bênçãos.

Agradeço à **Dra. Maria Fátima Grossi-de-Sá** por ter me recebido para estágio em seu laboratório quando cheguei em Brasília, em 2013. Agradeço pela orientação deste trabalho, por ter sido compreensiva com as minhas ausências durante o período de execução deste trabalho e pelas oportunidades que me proporcionou como estudante.

Agradeço aos meus co-orientadores **José Dijair Antonino** e **Roberta Coelho** pela primorosa co-orientação deste trabalho e pela amizade, incentivo, paciência e compreensão.

Agradeço à minha amiga irmã **Clídia Eduarda Moreira** apenas por existir em minha vida! Sem você essa Tese não teria forma. Obrigado pelos 11 anos de amizade, pelas palavras de motivação e por estar sempre ao meu lado nos dias de lutas e nos dias de glória.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições na avaliação deste trabalho.

Aos colaboradores do artigo científico gerado a partir dos dados desta tese, em especial ao **Daniel Noriega**, **Rayssa Garcia** e **Leonardo Pepino** pelos ensinamentos e contribuições substanciais para a finalização deste trabalho.

Aos membros do **LIMPP I** (Laboratório de Interação Molecular Planta Praga I – EMBRAPA-Cenargen), Alexandre Firmino, Ana Elizabeth, Athos, Bruno, Cristina, Danila, Elínea, Érico, Fabrício, Fernando, Helena, Isabela, Joaquin, Júlia, Mayara, Raquel, Regina, Reneida, Thuanne e Wagner, pelos momentos de descontração, boa convivência e apoio direto ou indireto durante o período do Doutorado.

Às amigas que foram imprescindíveis para que essa Tese fosse finalizada, pela partilha dos desabafos e por tanto carinho nestes anos de convivência: **Rayssa Garcia**, **Ana Gabriela** e **Daniela Amaral**.

Ao **Patrick Brito** pelo companheirismo, dedicação e cumplicidade na vida pessoal e profissional. Por ter estado sempre ao meu lado nesta reta final.

Aos meus pais, **Raimundo Moura** e **Socorro Nunes** por tanto amor e anos dedicados à criação dos filhos. Por serem exemplos de pais e representarem majestosamente o significado de família, o meu porto seguro.

Aos meus irmãos **Handerson Moura**, **Karinne Moura** e **Rayfran Moura** por tanto carinho, incentivo, orgulho e motivação. Pela cumplicidade fraterna de todos os anos.

Aos meus tios **Karina Nunes** e **Genival Nunes** e à minha avó **Francisca Nunes** por terem me acolhido em Brasília de braços abertos e por tanto amor, incentivo e oportunidades proporcionadas.

Aos demais amigos, familiares e colaboradores que contribuíram indiretamente para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

A *Helicoverpa armigera* é um inseto generalista da ordem *Lepidoptera*, cuja ocorrência foi relatada nos anos 2012/2013 no Brasil e vem causando prejuízos à agricultura nacional no que concerne à viabilidade das culturas e o plantio sucessivo de espécies vegetais hospedeiras (algodão, feijão, milho e soja) em áreas muito extensas. Dessa forma, discute-se a importância do conhecimento sobre o ciclo de vida do inseto a fim de buscar métodos sustentáveis de controle para essa praga. Este trabalho propôs o estudo do transcrito de *Helicoverpa armigera* sob diferentes condições de alimentação do inseto em plantas de tabaco e algodão visando a geração de dados acerca da biologia molecular deste organismo e a identificação de genes candidatos que codifiquem moléculas essenciais à sobrevivência do inseto, para uso no controle deste inseto-praga. Após a montagem, este transcrito resultou em 53.497 *contigs* sendo que 3% dos genes anotados foram diferencialmente expressos para as condições de alimentação, o que representou um total de 1295 genes. Após as análises de enriquecimento de ontologia gênica, os genes com expressão mais significativa foram utilizados para a escolha de genes para a validação por qPCR, com base no valor de *fold change*, corroborando os valores de expressão encontrados em *RNA-seq*. Alguns genes diferencialmente expressos relacionados com os mecanismos de digestão, detoxificação de substâncias e componentes da membrana peritrófica do inseto foram validados. Novas análises detalhadas acerca de outros componentes destas vias são necessárias a fim de propor um modelo que justifique a diferença nos perfis de expressão para as condições estudadas. No que concerne a atuação de *H. armigera* como praga polífaga, vale ressaltar a importância do desenvolvimento de estratégias sustentáveis de controle, como a abordagem de silenciamento gênico via RNAi. Considerando a dificuldade de silenciamento de genes em lepidópteros relatada na literatura, principalmente se o dsRNA for administrado na hemolinfa do inseto, a segunda parte deste trabalho teve como objetivo avaliar diferentes estratégias para o silenciamento de genes deste inseto. Como gene alvo, foi utilizado um receptor de neuropeptídeo associado à integração metabólica, o receptor do hormônio adipocinético (AKHr). Foram analisadas as seguintes condições experimentais: vias de administração de dsRNA oral e tópica; *time course*

de silenciamento em 24, 48 e 72 horas após a ingestão de dsRNA; administração do dsRNA em diferentes doses na sua forma não encapsulada e encapsulada com a perspectiva de potencializar os efeitos do silenciamento, amostras de dsRNA para o gene AKHr e proteger a molécula da ação de possíveis nucleases intestinais. Entretanto, os resultados não demonstraram efeitos potencializadores no silenciamento gênico, possivelmente em virtude das propriedades químicas da partícula e do pH intestinal. Além disso, foi avaliada a influência dos efeitos do silenciamento no peso dos insetos utilizando dsRNA não encapsulado e não houve diferença significativa entre os grupos tratados com dsRNA e os controles. Desta forma, este trabalho reitera a necessidade de novas estratégias de silenciamento objetivando fenótipos que denotem a efetividade do controle biotecnológico desta praga via silenciamento gênico.

Palavras-chave: *Helicoverpa armigera*, transcriptoma, digestão, detoxificação, AKHr, RNA interferente.

ABSTRACT

Helicoverpa armigera is a generalist insect of the order Lepidoptera, whose occurrence was first reported in 2012/2013 in Brazil. This pest caused damage to national agriculture regarding the viability of crops and the successive planting of host plant species (cotton, beans, maize and soy) across large areas. Thus, we discuss the importance of knowledge about the life cycle of the insect in order to seek sustainable control methods for this pest. This work proposed the study of *Helicoverpa armigera* transcriptome under different conditions of insect feeding in tobacco and cotton plants aiming at the generation of data about the molecular biology of this organism and the identification of candidate genes that encode molecules essential for insect survival in controlling this insect pest. After assembly, this transcriptome resulted in 53,497 contigs of which 3% of the annotated genes were differentially expressed for feeding conditions, representing a total of 1295 genes. After gene ontology enrichment analysis, the genes with the most significant expression were used to select genes for qPCR validation based on the fold change value, corroborating the expression values found in RNA-seq. Some differentially

expressed genes related to the mechanisms of digestion, detoxification of substances and components of the insect's peritrophic membrane were validated. Further detailed analyses of other components of these pathways are necessary in order to propose a model that justifies the difference in expression profiles for the studied conditions. Regarding *H. armigera*'s role as a polyphagous pest, it is worth highlighting the importance of developing sustainable control strategies, such as through RNAi gene silencing approach. Considering the difficulty of gene silencing in lepidopterans reported in the literature, especially if dsRNA is administered to the insect hemolymph, the second part of this study aimed to evaluate different strategies for gene silencing of this insect. As target gene, a neuropeptide receptor associated with metabolic integration, the adipokinetic hormone receptor (AKHr) was selected. The following experimental conditions were analyzed: oral and topical dsRNA administration routes; silencing time course at 24, 48 and 72 hours after dsRNA ingestion; administration of dsRNA at different doses in its unencapsulated and encapsulated form with a view to enhancing the effects of silencing, dsRNA samples for the AKHr gene and protecting the molecule from the action of possible intestinal nucleases. However, these results showed no potentiating effects on gene silencing, possibly due to particle chemical properties and intestinal pH. In addition, the influence of silencing effects on insect weight was evaluated using unencapsulated dsRNA and there was no significant difference between the dsRNA-treated groups and the controls. Thus, this work reiterates the need for new silencing strategies aiming at phenotypes that denote the effectiveness of biotechnological control of this pest via gene silencing.

Keywords: *Helicoverpa armigera*, transcriptome, digestion, detoxification, AKHr, interfering RNA.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 - Aspectos biológicos de *Helicoverpa armigera*.....16

Figura 2 - Esquema de um experimento típico de RNA-seq.....24

CAPÍTULO I – MONTAGEM DE NOVO E ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DE LAGARTAS DE *Helicoverpa armigera* ALIMENTADAS COM TABACO E ALGODÃO

Figura 1 - Sobrevivência e desempenho alimentar de larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com algodão (*Gossypium hirsutum*) e tabaco (*Nicotiana benthamiana*). A) Porcentagem de sobrevivência dos insetos do 2º instar a pupa; B) Tempo até a pupação (em dias); C) Média de peso das pupas dos insetos de ambos os tratamentos (em miligramas). Os dados foram analisados com o teste T de Student (* P <0,05; * P <0,01; ** P<0,001).....46

Figura 2 - RNA total de lagartas quinto instar de *H. armigera* em gel de agarose 1% enviado para sequenciamento. Nos dois géis foram utilizadas alíquotas do marcador *1 Kb DNA Plus ladder (Invitrogen)*; As amostras 13 e 14 representam o RNA de Insetos alimentados com folhas de tabaco; 15 e 16 – RNA de Insetos alimentados com folhas de algodão. A amostra 25 representa a integridade do RNA correspondente ao *pool* de amostras de RNA das condições anteriores que foi utilizada para a montagem da biblioteca referência.....47

Figura 3 - Quantidade de *contigs* resultantes da montagem e anotação do transcrito. A – Quantidade de *contigs* anotadas e não anotadas após o alinhamento utilizando a ferramenta BLASTX. B – Quantidade de *contigs* resultantes após a retirada de sequências contaminantes..... 49

Figura 4 - Comparação das sequências do transcrito de *H. armigera* com outras espécies de insetos a partir da distribuição de BLASTx contra o banco de dados de proteína NR (*non-redundant*) do NCBI..... 52

Figura 5 - Classificação em termos de GO do transcrito de <i>H. armigera</i> . Os termos foram classificados nas seguintes categorias: Componente Celular, Função Molecular e Processo Biológico e estão representados quanto ao número de <i>contigs</i>	54
Figura 6 - Famílias de proteínas mais abundantes no transcrito de <i>H. armigera</i>	55
Figura 7 - Abundância de genes codificantes para enzimas relacionadas às vias metabólicas de <i>H. armigera</i>	55
Figura 8 - <i>Heat-map</i> representando os níveis de expressão normalizados dos genes diferencialmente expressos nas bibliotecas de algodão e tabaco. Os <i>contigs</i> foram agrupados em dois <i>subclusters</i> diferentes. A escala mostrando os valores de $\text{Log}_2(\text{FPKM})$ representa os níveis de expressão desde o menor (-4) até o maior (4).....	57
Figura 9 - Agrupamentos de genes expressos diferencialmente gerados pelo <i>EdgeR</i> , em função dos valores de $\text{Log}_2(\text{FPKM})$. Um total de 743 genes foram super-expressos nos insetos alimentados com folhas de tabaco em detrimento dos 552 genes ativados em condições de alimentação com folhas de algodão.....	58
Figura 10 - Quantidade total de termos enriquecidos de GO (<i>EGOT's</i>) associada aos genes diferencialmente expressos encontrados no transcrito de <i>H. armigera</i> . A figura representa o número de termos inicial obtido mediante a análise de enriquecimento do software <i>FUNC</i> , bem como a quantidade de termos resultantes da filtragem mediante análise com a ferramenta <i>REVIGO</i> . Os dois agrupamentos de genes (super-expressos e sub-expressos) estão determinados para os insetos alimentados com algodão em relação aos insetos alimentados com tabaco.....	59
Figura 11 - Termos GO mais enriquecidos para cada conjunto de genes diferencialmente expressos no transcrito de <i>H. armigera</i> . Em A, estão representados os termos não redundantes, com maior frequência observada para os grupos de genes super expressos em insetos alimentados com algodão, obtidos a partir da análise do <i>FUNC</i> . Em B, os termos relacionados aos genes sub expressos para a condição alimentação com algodão. A figura mostra os termos das três categorias principais de ontologia gênica: processos biológicos, função molecular e componente celular.....	60

Figura 12 - Validação de 28 genes envolvidos nas vias de nutrição e desintoxicação de insetos em resposta a diferentes dietas (folhas de algodão ou tabaco). As linhas indicam os valores de DEGs na análise de RNA-seq e as barras indicam a análise de RT-qPCR. Ambos os valores foram transformados em Log2 de alteração de dobra (Log2FC).....63

CAPÍTULO II – DESAFIOS E PERSPECTIVAS PARA O SILENCIAMENTO GÊNICO EM *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: noctuidae)

Figura 1 - Expressão relativa do gene do receptor de AKH (AKHr) durante o estágio larval de *Helicoverpa armigera*.....85

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de dsRNA sintetizado para o gene do AKHr e o dsRNA para o GFP. 1. Marcador 1 Kb Plus (Invitrogen). 2, 3, 4 e 5 dsRNA para o gene AKHr (400 pb). dsRNA para GFP. Foram feitas alíquotas separadas de dsRNA para AKHr utilizando o mesmo DNA resultante da PCR com o DNA plasmidial.....86

Figura 3 - Expressão relativa do gene do AKHr ao longo do tempo após ingestão de dsRNA para o gene em questão. Nesses experimentos foi utilizada uma dose de 1000 ng de dsRNA misturado à dieta para posterior ingestão por lagartas de quinto instar de *H. armigera*.....87

Figura 4 - Expressão relativa do gene do AKHr em lagartas de quinto instar de *H. armigera* submetidas a experimento de silenciamento utilizando dsRNA para o AKHr.....88

Figura 5 - Expressão relativa do gene do AKHr após experimento de silenciamento gênico utilizando dsRNA para AKHr livre e encapsulado (1000 ng) através de alimentação em dieta.....89

Figura 6 - Expressão relativa do gene do AKHr após experimento de silenciamento gênico utilizando dsRNA para AKHr livre e encapsulado (2000 e 4000 ng) através de alimentação em dieta.....90

Figura 7 - Expressão do gene do AKHr após administração de dsRNA não encapsulado via aplicação tópica. Os números 5 e 6 correspondem, respectivamente às amostras de lagartas do quinto e do sexto instar.....91

Figura 8 - Avaliação do peso corporal em insetos alimentados com diferentes concentrações de dsRNA para o gene do AKHr. As lagartas foram alimentadas no quinto instar.....	92
Figura 9 - Avaliação do peso corporal em insetos alimentados com diferentes concentrações de dsRNA para o gene do AKHr. As lagartas foram alimentadas no quinto instar e observadas até atingirem a fase de pupa ou adulto.....	93

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – MONTAGEM DE NOVO E ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DE LAGARTAS DE *Helicoverpa armigera* SUBMETIDA A DIFERENTES DIETAS

Tabela 1 - Lista de *primers* referentes aos genes utilizados para a normalização das condições de expressão dos genes de *H. armigera* em condições de alimentação com tabaco e algodão.....41

Tabela 2 - Lista de *primers* referentes aos genes escolhidos para a validação do transcrito de *H. armigera* em condições de alimentação com tabaco e algodão..42

Tabela 3 - Pré-processamento das sequências antes da montagem do transcrito de *H. armigera*.....48

Tabela 4 - Montagem e Completude do transcrito de *H. armigera*.....51

Tabela 5 - Lista dos melhores Genes de referência de acordo com *RefFinder*.....61

CAPÍTULO II – DESAFIOS E PERSPECTIVAS PARA O SILENCIAMENTO GÊNICO EM *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: noctuidae)

Tabela 1 - Lista de primers utilizados para clonagem e RT-qPCR.....81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1.1 Aspectos bioecológicos e comportamentais de <i>Helicoverpa armigera</i>	15
1.2 Ocorrência e prejuízos de <i>Helicoverpa armigera</i> no mundo e no Brasil.....	18
1.3 Controle de <i>Helicoverpa armigera</i>.....	21
1.4 Transcritoma de insetos.....	22
1.5 RNA interferente no controle de pragas.....	26
2. OBJETIVOS.....	29
2.2 Objetivo geral.....	29
2.3 Objetivos específicos.....	29
CAPÍTULO I – MONTAGEM <i>DE NOVO</i> E ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DE LAGARTAS DE <i>Helicoverpa armigera</i> ALIMENTADAS COM ALGODÃO E TABACO.....	30
RESUMO.....	31
1. INTRODUÇÃO.....	32
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo Geral.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3. METODOLOGIA.....	36
3.1 Obtenção dos insetos, bioensaio de alimentação e extração de RNA.....	36
3.2 Construção da biblioteca de cDNA e Sequenciamento.....	37
3.3 Pré-processamento das sequencias.....	38
3.4 Montagem dos contigs, Anotação e Ontologia Gênica.....	38
3.5 Análises de Expressão Diferencial.....	40
3.6 Enriquecimento dos Termos de Ontologia Gênica (GO).....	40
3.7 Normalização de genes referência e Validação do transcritoma.....	41
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Desempenho larval em folhas de tabaco versus algodão.....	44

4.2 Obtenção do RNA total	45
4.3 Sequenciamento e pré-processamento dos dados	47
4.4 Montagem e anotação do transcrito.....	49
4.5 Ontologia Gênica (GO) e Análise de Vias Metabólicas	53
4.6 Expressão Diferencial de Genes	56
4.7 Análise de enriquecimento por ontologia gênica	58
4.8 Normalização de genes para qPCR e validação de genes do transcrito.....	60
5. DISCUSSÃO	64
5.1 Desenvolvimento de <i>Helicoverpa armigera</i> nas duas dietas.....	64
5.2 Respostas Transcricionais relacionadas às dietas.....	68
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
CAPÍTULO II – DESAFIOS E PERSPECTIVAS PARA O SILENCIAMENTO GÊNICO EM <i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera: noctuidae).....	72
RESUMO	73
1. INTRODUÇÃO	74
2. OBJETIVOS	78
2.1 Objetivo Geral.....	78
2.2 Objetivos específicos	78
3. METODOLOGIA.....	78
3.1 Identificação do gene AKH no transcrito de <i>Helicoverpa armigera</i>	79
3.2 Obtenção dos insetos, extração de RNA e síntese de cDNA.....	79
3.3 Análise da expressão de AKHr por RT-qPCR.....	80
3.4 Desenho, Clonagem e síntese do dsRNA	81
3.5 Síntese das nanopartículas: o complexo quitosana/dsRNA/sufactante.....	82
3.6 Bioensaios de silenciamento do gene AKHr	83
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
4.1 Análise da expressão do gene do AKHr	84
4.2 Avaliação do silenciamento do gene do AKHr via oral	85

4.3 Avaliação do silenciamento do gene do AKHr usando aplicação tópica	90
4.4 Efeitos do silenciamento no peso dos insetos	92
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	93
REFERÊNCIAS	94
APÊNDICE	Erro! Indicador não definido.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Aspectos bioecológicos e comportamentais de *Helicoverpa armigera*

O gênero *Helicoverpa* (Hardwick 1965) (Lepidoptera: Noctuidae) é composto por um grupo de 18 espécies, distribuídas entre todos os continentes, que inclui alguns dos insetos-praga mais devastadores de culturas agrícolas no mundo. A espécie *Helicoverpa armigera* é considerada a praga agrícola com maior distribuição geográfica e a mais prejudicial economicamente deste gênero (BEHERE et al., 2007; THOMAZONI et al., 2013). *H. armigera* é um inseto holometábolo, ou seja, apresenta metamorfose completa durante o seu desenvolvimento biológico, passando pelas fases de ovo, lagarta, pupa até chegar à fase adulta (ALI; CHOUDHURY, 2009; ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013) (Figura 1). O ciclo de vida de *H. armigera*, de ovo até a emergência do adulto, depende da alimentação e das condições climáticas com duração média de 30 a 60 dias (JAYARAJ, 1981; GUEDES et al., 2013; ALI; CHOUDHURY, 2009). Por exemplo, o tempo de desenvolvimento de *H. armigera* alimentadas em tomate ou grão de bico (Hashem) é de aproximadamente 45 e 32 dias, respectivamente (RAZMJOU et al., 2014).

Considerando os aspectos relacionados à biologia do inseto, é válido mencionar que as mariposas têm alta capacidade de dispersão, além do considerável potencial reprodutivo, sendo que cada fêmea pode colocar até 3.000 ovos e, dependendo das condições climáticas, podem ocorrer 2 a 11 gerações por ano (EPPO, 2007; NASERI et al., 2011). As fêmeas depositam seus ovos de forma isolada ou em pequenos agrupamentos sobre talos, flores, frutos e folhas, preferencialmente no período noturno (CZEPAK et al., 2013a; ALI; CHOUDHURY, 2009). Para a postura, prefere a face adaxial das folhas e superfícies pubescentes (EPPO, 1981). Os ovos de *H. armigera* são branco-amarelados e apresentam aspecto brilhante logo após a postura, adquirindo uma coloração marrom-escuro momentos antes da eclosão da larva. Os ovos medem cerca de 0,42 mm a 0,60 mm de comprimento e de 0,40 mm a 0,55 mm de largura e o período de incubação é, em média, 3,3 dias (ALI; CHOUDHURY, 2009) (Figura 1).

Ciclo de vida

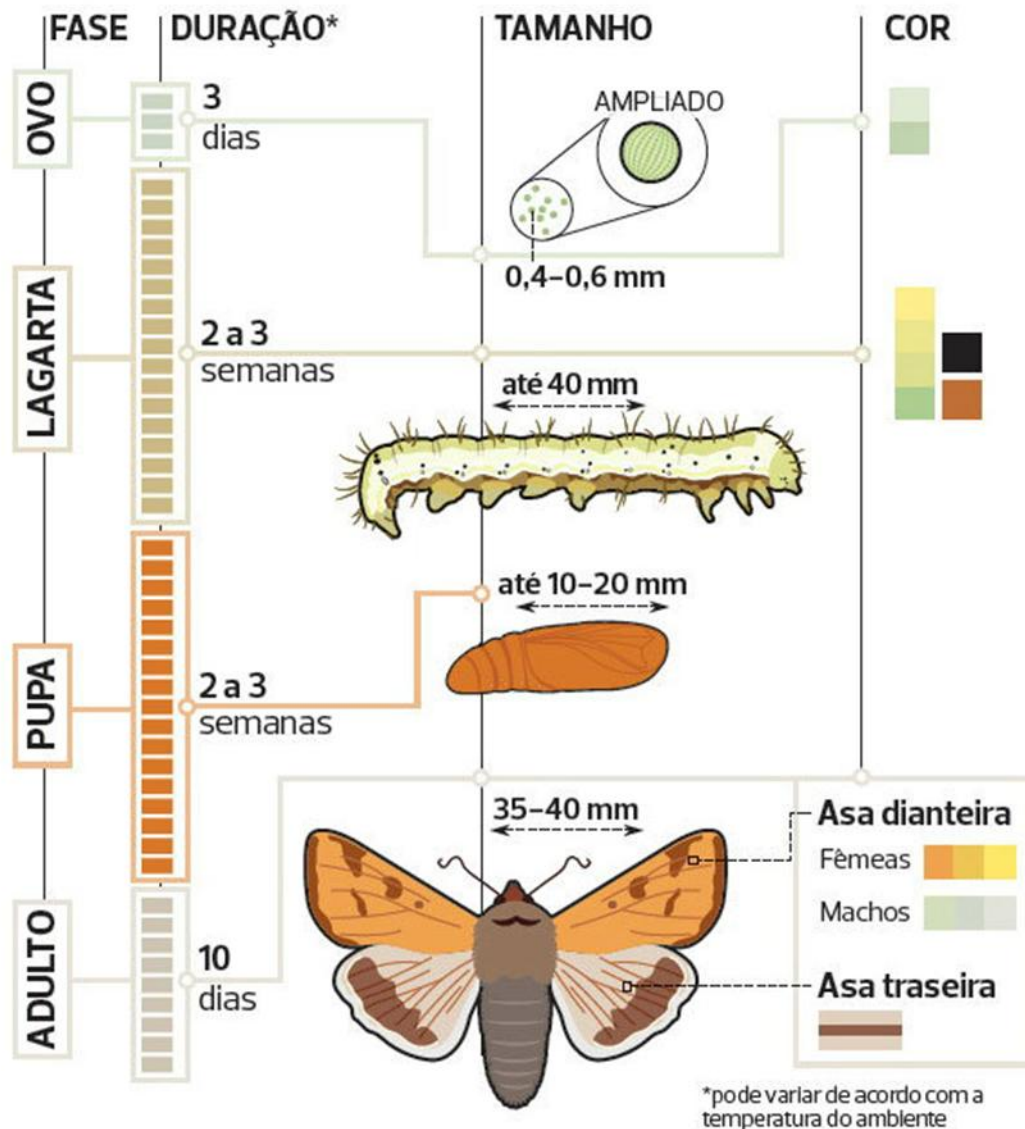


Figura 1. Aspectos biológicos de *Helicoverpa armigera*. Fonte: ABRAPA, 2013.

O período larval é constituído por cinco a seis ínstaes e pode durar de duas a três semanas, dependendo da alimentação e das condições climáticas (EPPO, 1981; CZEPAK et al., 2013b). As lagartas nos ínstaes finais apresentam coloração variando do verde, castanho, marrom ou preto com linhas laterais coloridas ou não, sendo a coloração das larvas determinada principalmente pela parte da planta na qual as larvas se alimentam (YAMASAKI et al., 2009). No último ínstar a lagarta

possui de 30,0 mm a 40,0 mm de comprimento (EPPO, 1981; GUEDES et al., 2013) (Figura 1). São detalhes característicos da lagarta: a sua cápsula cefálica de cor parda clara, linhas finas brancas laterais, a presença de pelos e a textura do tegumento com aspecto levemente coriáceo (ÁVILA et al., 2013; CZEPAK et al., 2013b). As lagartas no quarto ínstar apresentam tubérculos escuros, dispostos na forma de semicírculos, na região dorsal do primeiro segmento abdominal. Essa é uma característica marcante para a identificação da espécie *H. armigera* (CZEPAK et al., 2013a). Um aspecto importante a ser observado nas lagartas de *H. armigera* é sua movimentação comportamental quando submetida a um toque. Em resposta a esse estímulo, a lagarta encurva a cabeça em direção ao primeiro par de falsas pernas abdominais, um provável comportamento de defesa (ÁVILA et al., 2013). Durante a alimentação, as lagartas preferem as partes jovens das plantas priorizando as estruturas reprodutivas. Isso se deve ao fato de que as lagartas, principalmente do terceiro ao quinto ínstar, apresentam altos níveis de proteinases no aparelho digestório (PATANKAR et al., 2001). No final do último ínstar a lagarta cessa sua alimentação e, dessa forma, entra na fase de pré-pupa (ARAÚJO, 1990).

A fase de pupa tem duração de aproximadamente 12 dias e ocorre no solo. Dependendo das condições climáticas, nesta fase, elas podem entrar em diapausa, estratégia importante utilizada pelo inseto para sobreviver às condições ambientais desfavoráveis (KARIM, 2000). No caso de *H. armigera*, as plantas hospedeiras têm um efeito direto sobre a indução de diapausa. Por exemplo, lagartas que se alimentam de algodoeiro e tomateiro são consideradas como mais propensas a entrarem em diapausa (LIU et al., 2010). As pupas são fusiformes, com comprimento variando entre 12 mm e 20 mm e apresentam coloração verde-claro no início e, com o processo de esclerotização do exoesqueleto, ao fim de 24 horas, passam a marrom-mogno (ALI; CHOUDHURY, 2009; DIAS, 2005) (Figura 1). Nessa fase já é possível fazer a distinção de sexo através da observação da genitália externa (ALI; CHOUDHURY, 2009).

A fase adulta é caracterizada por um acentuado dimorfismo sexual, podendo o macho e a fêmea serem diferenciados pela cor e tamanho das asas. Os machos apresentam o primeiro par de asas de coloração cinza esverdeado e as fêmeas pardas alaranjadas (EPPO, 1981; EPPO, 1996). A envergadura nos machos é de 35

mm enquanto que nas fêmeas é de 40 mm. O formato do abdômen é outra diferença encontrada, o abdômen das fêmeas é mais arredondado em comparação ao dos machos (JAYARAJ, 1981). Ambos apresentam, sobre as margens das asas anteriores, uma linha com sete a oito manchas e, logo acima, uma faixa marrom, irregular e transversal, e na parte central, uma marca em forma de vírgula. As asas posteriores são mais claras e apresentam, na extremidade apical, uma borda marrom escura com uma mancha clara no centro (CZEPAK et al., 2013a; b) (Figura 1). As fêmeas apresentam uma alta fecundidade que pode variar de acordo com a temperatura, a umidade e com a fonte de alimento durante a fase larval (HEMATI et al., 2013). A longevidade média desses insetos é de 11,7 dias para fêmeas e de 9,2 dias para machos (ALI; CHOUDHURY, 2009).

Os adultos são atraídos por flores que produzem néctar, sendo esse recurso de grande importância, principalmente para escolha do hospedeiro, que influência também a longevidade e a capacidade de oviposição desses insetos (CUNNINGHAM et. al., 1999). As mariposas mostram preferência por alimentos provenientes de hospedeiros nos quais elas já tiveram uma experiência anterior (CUNNINGHAM et. al., 1998). Os adultos possuem hábitos preferencialmente noturnos, logo realizam atividades como acasalamento, oviposição e alimentação ao entardecer e ao longo da noite (JAYARAJ, 1981). Ademais, os adultos de *H. armigera* são mariposas migrantes naturais e apresentam movimento de longo alcance, podendo chegar a 1.000 km de distância. Essa migração ocorre no período noturno e a favor do vento (FITT et al., 1995; PEDGLEY, 1985).

Dessa forma, o conhecimento das características biológicas desse inseto é de fundamental importância na busca de métodos alternativos de controle para essa praga agrícola mundial.

1.2 Ocorrência e prejuízos de *H. armigera* no mundo e no Brasil

A espécie *H. armigera* possui ampla ocorrência mundial, tendo registros em países da Ásia (China e Índia), África, Europa e Oceania (Austrália) (TAY et al., 2013) e é considerada uma das mais importantes pragas da Agricultura mundial

devido ao seu histórico de grandes surtos populacionais, dificuldades de manejo/controlado e enormes prejuízos econômicos (ALVI et al., 2012; DEGRANDE; OMOTO, 2013). No continente americano, a espécie foi identificada inicialmente em 2013 no Brasil, nos estados de Goiás, Mato Grosso, Bahia e Paraná (CZEPAK et al., 2013a; SPECHT et al., 2013; TAY et al., 2013). Além do Brasil, foi relatada a ocorrência desta praga em outros países da América do Sul como, em 2013, no Paraguai (SENAVE, 2013); em 2014 na Argentina (MURÚA et al., 2014); e em 2016 no Uruguai (CASTIGLIONI et al., 2016). Porém, dada à extensão da área infestada e a alta abundância, é provável que tenha estado presente na América do Sul durante algum tempo antes da detecção de sua ocorrência (KRITICOS et al., 2015). A presença do inseto também foi relatada em Porto Rico (NORTH AMERICAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION, 2014) e nos Estados Unidos (PEST ALERT, 2015).

No ano de 2014 em Porto Rico, desde que foi encontrado um inseto macho, em uma plantação de feijão, especialistas têm alertado os principais centros produtores nos EUA, pedindo atenção e monitoramento da praga (APHIS, 2014). Neste contexto, em 2015, foi relatada a primeira ocorrência de *H. armigera* nos Estados Unidos, no estado da Flórida, em cultivo de tomateiros, onde foram coletados três insetos adultos machos (APHIS, 2015).

As lagartas de *H. armigera* foram registradas em cerca de 70 famílias de plantas hospedeiras (FITT, 1989; POGUE, 2004), demonstrando que este inseto possui grande capacidade de se desenvolver em ampla gama de hospedeiros causando perdas expressivas na produção de alimentos, grãos, fibras e plantas ornamentais, mundialmente (FITT, 1989; SRIVASTAVA et al., 2010; CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2014).

No Brasil, foi avaliada como uma praga emergente atacando lavouras como milho, soja e algodão (CZEPAK et al., 2013b). Posteriormente foi encontrada em tomate, trigo, canola, girassol, feijão, milheto, sorgo, pastagens, guandu, crotalária e nabo forrageiro, entre outras, atingindo mais de 180 espécies de plantas de ocorrência natural ou cultivadas, além de se alimentar de plantas daninhas (BUENO et al., 2014; SALVADORI; SUZANA, 2014; PRATISSOLI et al., 2015). Entre as espécies de plantas frutíferas, hospedeiras dessa praga mundialmente, destacam-se

os citros, a mangueira, a nectarina e o pêssego (CABI, 2014). Apesar de ter sido identificada no Brasil apenas em 2013, desde 2008 há indícios da ocorrência desta praga em baixo nível populacional e pouco efeito na destruição de lavouras em território brasileiro (SOSA-GÓMEZ et al., 2016).

H. armigera apresenta alta capacidade de sobrevivência, mesmo em condições adversas, haja vista que o hábito alimentar polífago tende a favorecer o sucesso da espécie como praga. As lagartas podem se alimentar de folhas e caules, mas preferencialmente se alimentam de brotos, flores e frutos, causando danos tanto na fase vegetativa como reprodutiva (CZEPAK et al., 2013a; b). As mariposas adultas também demonstram alta mobilidade e fecundidade individual muito elevada, o que contribui para a dispersão e aumento das populações da espécie (Embrapa, 2013). Além disso, hospedeiros alternativos, nas proximidades agrícolas, assumem papel decisivo na dinâmica sazonal dos insetos, pois podem dar suporte à permanência de populações das pragas (FITT, 1989; AZAMBUJA, 2016).

Por ser uma espécie extremamente polífaga, *H. armigera* se alimenta mais rápido que as outras pragas presentes no Brasil e, por isso, apresenta grande potencial de destruição. Essa lagarta vem causando inúmeras perdas em lavouras brasileiras desde 2012. A espécie *Helicoverpa armigera* (Hubner), recém-identificada no Brasil (SPECHT et al., 2013; CZEPAK et al., 2013a), pertence ao grupo de lagartas da subfamília Heliiothinae e antes era considerada como praga quarentenária. Por ser um inseto polífago, *H. armigera* tem se alastrado amplamente atacando diversas culturas no Brasil, causando danos principalmente em lavouras de soja, algodão, feijão, milho, tomate, trigo, frutíferas, girassol, dentre outras (ÁVILA et al., 2013; CZEPAK et al., 2013a).

No estado da Bahia, na safra 2011/2012 os ataques em culturas de soja, milho e, especialmente, de algodoeiro causaram perdas de até 80% da produção, severos danos em diferentes estágios da cultura e dificuldades de manejo, devido à ausência de produtos registrados para o seu controle na época em que o inseto foi identificado no país (CZEPAK et al., 2013b). Na safra de 2012/2013, segundo os produtores, os prejuízos na produção foram de R\$ 140,00/ha, além de custos advindos de necessidade de aplicações adicionais de inseticidas nas lavouras

(ÁVILA et al., 2013; CZEPAK et al., 2013a). No mundo, os custos anuais em razão das perdas de produção e do controle da lagarta *H. armigera* chegam a US\$ 5 bilhões de dólares (LAMMERS; MACLEOD, 2007; ÁVILA et al., 2013).

Esse Lepidóptero atinge grandes e pequenos produtores e vem causando grandes preocupações à Agricultura nacional, no que concerne à viabilidade das culturas e o plantio sucessivo de espécies vegetais hospedeiras (algodão, feijão, milho e soja, por exemplo), em áreas muito extensas e próximas, o que contribui para a disponibilidade de alimento para o inseto ao longo das cadeias de produções anuais. Além disso, por se tratar de uma nova praga, há pouco conhecimento sobre as estratégias de manejo e controle atreladas às condições ambientais favoráveis ao seu estabelecimento, o que promove o aumento no número de aplicações de produtos químicos e, conseqüentemente, elevação nos custos de manejo das culturas (DEGRANDE; OMOTO, 2013).

1.3 Controle de *Helicoverpa armigera*

Dentre os métodos de controle dessa importante praga agrícola, a aplicação de inseticidas químicos tem sido utilizada como a principal ferramenta de manejo em várias regiões do mundo (ALVI et al., 2012; FATHIPOUR; SEDARATIAN, 2013; VOJOURI et al., 2016). Além de serem onerosos e provocarem o acúmulo de compostos tóxicos no ambiente, têm demonstrado pouca eficiência para o controle desta praga.

A *H. armigera* era uma praga quarentenária e, portanto, não havia produtos registrados para o seu controle no Brasil quando foi registrada a sua primeira ocorrência, o que ocasionou na liberação de alguns produtos contra o desenvolvimento do inseto, em caráter emergencial, cujo uso perduraria até março de 2016 (BRASIL, 2013). Atualmente, conforme determinação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA), 34 formulações, dentre produtos químicos e biológicos, são registradas para o controle da praga no país (AGROFIT/MAPA, 2016).

Os impactos ambientais e para o ser humano aliado ao desenvolvimento de resistência resultante da utilização de inseticidas químicos para o controle de insetos praga vêm aumentando o interesse por alternativas mais sustentáveis de controle dessas pragas. Dentre essas alternativas, o controle biológico com a bactéria *Bacillus thuringiensis* tem se destacado no controle de *H. armigera* (BRAVO et al., 2011; CHELLIAH et al., 2011; LI; BOUWER, 2014; SEBASTIÃO et al., 2015) e de outros lepidópteros (PEREIRA et al., 2009; PÉREZ-GUERRERO et al., 2012).

O controle biológico é uma estratégia importante para o manejo de *H. armigera*, principalmente porque pode ser associado a outros tipos de controle (FATHIPOUR; SEDARATIAN, 2013; CABI, 2014). Além de *B. thuringiensis*, para o controle biológico de *H. armigera*, são utilizados parasitoides pertencentes a diversas famílias como Braconidae (THANAVENDAN; JEYARANI, 2010), Ichneumonidae (ZHANG et al., 2006), Tachinidae (GUERRA et al., 2014), Trichogrammatidae (KRISHNAMOORTHY, 2012), dentre outras. Em 2014, no Brasil, a espécie *Trichogramma pretiosum* foi utilizada em lavouras de soja, algodão, milho e feijão para o controle de ovos de noctuídeos, como *H. armigera* (PARRA, 2014), tornando-se uma possível ferramenta no controle de *H. armigera* em cultivos brasileiros (EMBRAPA, 2013).

Nesse cenário, apesar dos métodos já apresentados para o controle de *H. armigera*, como o controle químico e o controle biológico, faz-se necessário o conhecimento da biologia do inseto nas diferentes culturas no Brasil, para entender seu ciclo biológico, dinâmica e buscar métodos alternativos e eficientes de controle para essa praga (AZAMBUJA, 2016).

1.4 Transcritoma de insetos

O sequenciamento do genoma de insetos possibilita o desenvolvimento de estudos de genômica funcional, análise comparativa do conteúdo dos genomas e sua organização, estudo de transcritomas e também a análise de parâmetros como, capacidade de transmissão de doenças, etologia, estudos de evolução,

desenvolvimento, dentre outros. Apesar da progressiva eficiência das tecnologias de nova geração (NGS – do inglês *Next Generation Sequencing*) durante a última década, o sequenciamento de genomas complexos ainda permanece caro. Dessa forma, o sequenciamento de transcritos expressos é uma alternativa para a obtenção de sequências correspondentes às porções ou transcritos completos de genes, uma vez que o custo é bem inferior ao sequenciamento de um genoma inteiro. Além disso, o sequenciamento de transcritomas possibilita o estudo simultâneo da expressão e da regulação de genes em diferentes tecidos e processos biológicos, possibilitando avanços na identificação e caracterização de genes (EMRICH et al., 2007; MARDIS, 2008).

De forma mais específica, o estudo de transcritomas de insetos tem sido empregado para avaliar o perfil de expressão de genes para um determinado uso biotecnológico, e se tornou uma ferramenta efetiva para a busca de moléculas potenciais para o uso no controle da população de insetos. Particularmente, a estratégia de sequenciamento *RNA-Seq* (Illumina) tem sido utilizada com o objetivo de elucidar mecanismos envolvidos na resistência aos inseticidas, digestão e imunidade inata (XIE et al., 2012; SPARKS et al., 2013), além da expressão diferencial de transcritos relacionados ao comportamento, neurotransmissão, neurotoxicidade e reprodução (SPARKS et al., 2014).

Por meio da técnica de *RNA-seq* é possível sequenciar, com grande acurácia, o transcritoma de qualquer organismo, sempre que a obtenção de RNA total de alta qualidade seja viável. O transcritoma é o conjunto de transcritos (RNAs mensageiros - RNAm) presentes numa célula e a quantificação da sua expressão. A compreensão do transcritoma é essencial para interpretar o genoma desde uma abordagem funcional e para comparar diferentes condições, tecidos ou etapas de desenvolvimento (WANG et al., 2009).

Em relação a outras técnicas para quantificar transcritos, como hibridação do RNA, microarranjos e sequenciamento do tipo Sanger, a técnica de *RNA-seq* possui notáveis vantagens tanto para mapear quanto para quantificar transcritomas. *RNA-seq* usa as tecnologias de NGS para sequenciar populações de RNA convertidas em bibliotecas de DNA complementar (cDNA), contendo adaptadores nos extremos das

moléculas de RNA (MORTAZAVI et al., 2008). Os *reads* obtidos no sequenciamento podem ser posteriormente alinhados com um genoma ou transcrito de referência ou montados *de novo* para gerar um mapa de transcrição formado pela estrutura transcricional dos genes e o nível de expressão de cada um deles (ROBERTSON et al., 2010). O esquema de um típico experimento de *RNA-seq*, desde a geração até análise dos dados, pode ser visualizado na figura 2.

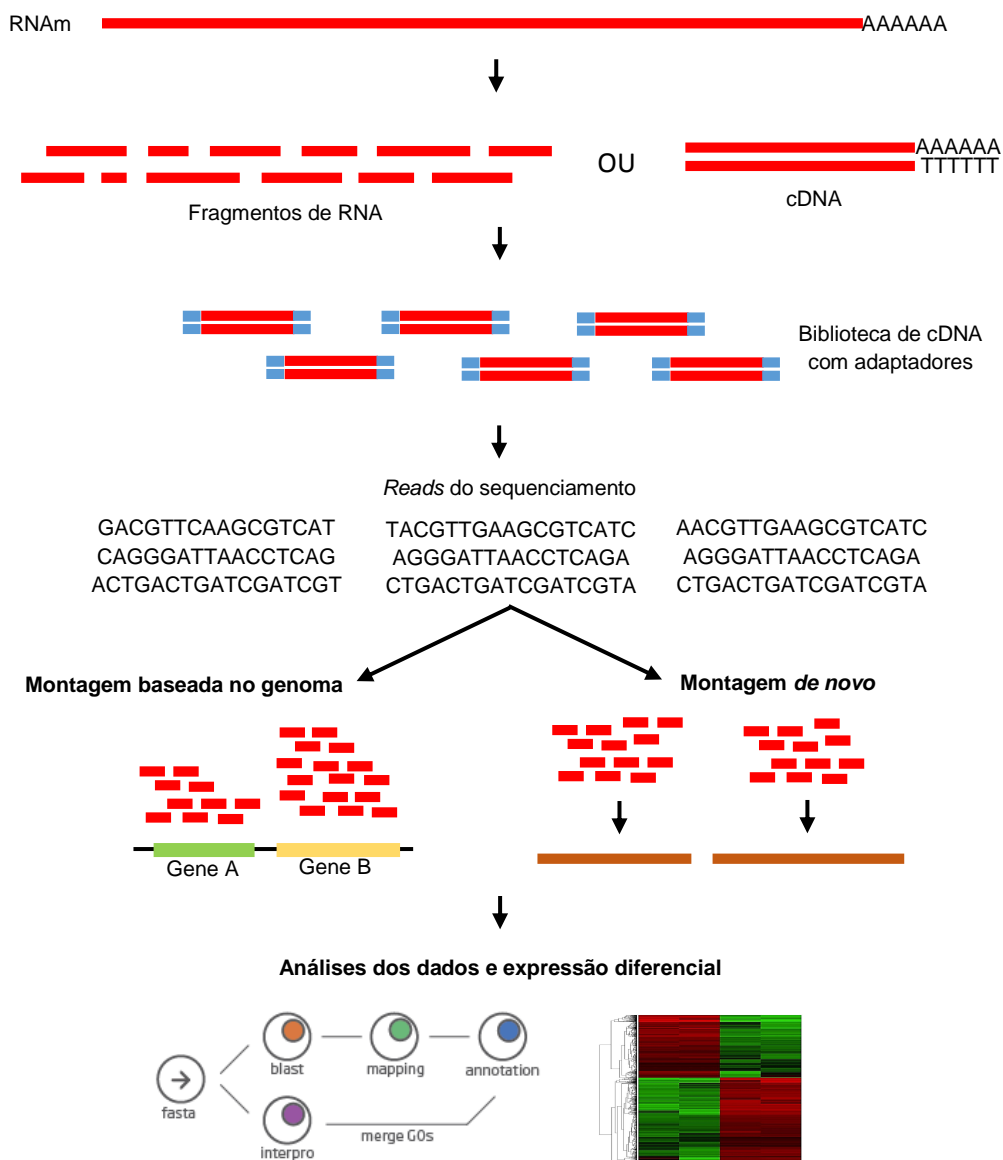


Figura 2. Esquema de um experimento típico de RNA-seq. RNAs longos são primeiro convertidos em uma biblioteca de cDNA através da fragmentação do RNA ou do DNA. Adaptadores usados no sequenciamento (azul) são adicionados nas extremidades de cada

fragmento de cDNA e sequências curtas (*reads*) são obtidas após o sequenciamento dos cDNAs usando a tecnologia de NGS de alto rendimento. Os *reads* resultantes são alinhados com o genoma ou transcrito de referência para a obtenção dos contigs (marrom). Após a montagem, análises como anotação e expressão diferencial podem ser realizadas. As informações contidas na legenda e na figura foram baseadas em Conesa et al. (2005) (Blast2GO), Wang et al. (2009), Martin e Wang (2011) e Haas et al. (2013).

Em relação à *H. armigera*, alguns estudos têm investigado o transcrito do inseto em diferentes condições. Recentemente, um grupo de pesquisa chinês analisou o transcrito do inseto frente à interação com o nucleopoliedrovírus (*HearNPV*), que é amplamente utilizado para o controle biológico desta praga. Considerando a ausência do entendimento acerca do mecanismo molecular subjacente à infecção viral, foi realizado o sequenciamento de RNA integrado à análise proteômica quantitativa dos corpos gordurosos do inseto em estágio larval. A expressão gênica foi alterada após a infecção, resultando em 3.850 genes expressos diferencialmente, incluindo um grupo de 60 genes envolvidos com a imunidade contra vírus, cuja expressão foi reduzida após a infecção pelo baculovírus, justificando os efeitos do patógeno sobre o desenvolvimento do inseto (XING et al., 2017).

Com os avanços da aplicação da biologia molecular e de tecnologia genômica na área entomológica, novas informações têm sido geradas, necessitando de novas ferramentas para o armazenamento de dados. Com isso, foram criados bancos de dados de insetos que contêm informações de proteínas, processos bioquímicos e fisiológicos que ocorrem nesses organismos (CHILANA et al., 2012). Recentemente, esforços têm sido concentrados na criação e constante atualização de bancos de dados genômicos, de transcritos e proteínas para os mais diversos insetos estudados, a exemplo do *Agripestbase* (<http://agripestbase.org/>), que armazena grande parte da informação genômica de vários insetos-praga. Tais ferramentas são úteis para o desenvolvimento de novos métodos de manejo de pragas e identificação de possíveis alvos biotecnológicos para o controle de insetos-praga.

1.5 RNA interferente no controle de pragas

O mecanismo de RNA interferente (RNAi) é um processo que ocorre naturalmente nas células e em diversos organismos eucarióticos. Esse mecanismo descrito primeiramente em plantas, foi denominado como silenciamento gênico pós-transcricional (JORGENSEN et al., 1996). A primeira descrição de silenciamento gênico em animais, assim como sua melhor compreensão, foi obtida em *Caenorhabditis elegans*, organismo modelo nesses estudos (FIRE et al., 1998). Atualmente, sabe-se que o processo de RNAi participa de forma integral na regulação da expressão gênica em várias plantas e outros eucariotos (LILLEY et al., 2007).

O processo básico de RNAi pode ser dividido em três etapas principais (TOMARI; ZAMORE, 2005). Inicialmente, uma molécula de dsRNA longo, endógena ou exógena, respectivamente expressa ou introduzida na célula, é processada em pequenos duplexes de RNA, de aproximadamente de 21 a 23 nucleotídeos, por uma ribonuclease do tipo III (RNase III), chamada Dicer. Os organismos podem apresentar mais de uma enzima Dicer, cada uma responsável por um tipo diferente de pequenos duplexes de dsRNA (MEISTER; TUSCHL, 2004). Por exemplo, em *Drosophila melanogaster*, a Dicer-1 está envolvida principalmente em produzir micro RNAs (miRNAs), enquanto a Dicer-2 é responsável pelo processamento de dsRNAs longos em siRNA (do inglês *short interfering RNA*) (LEE et al., 2004). Na segunda etapa do mecanismo de RNAi, as fitas dos pequenos duplexes são separadas e uma dessas fitas, denominada fita guia, é acoplada preferencialmente a um complexo de proteínas conhecido como complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC - do inglês - RNA *induced silencing complex*). A outra fita, denominada fita passageira, é degradada. Na terceira etapa, o complexo RISC encontra potenciais RNAm alvo que compartilham similaridade de sequência completa ou parcial. A fita guia direciona a clivagem do RNAm alvo por uma endonuclease ligada ao RISC, uma Argonata (TERENIUS et al., 2011).

A aplicação de RNAi para validação funcional de genes tem sido utilizada nos mais diversos organismos. Especificamente em lepidópteros, um número maior de experimentos tem sido feito com os insetos *Bombyx mori* e *Manduca sexta* (TERENIUS et al., 2011). As primeiras publicações de RNAi em lepidópteros foram publicadas em 2002. A injeção de dsRNA correspondente ao gene *white* (branco) em embriões de *B. mori*, visando o silenciamento desse gene, resultou em fenótipos semelhantes aos observados em insetos mutantes para o locus do ovo branco três: ovos brancos e pele larval translúcida (QUAN et al., 2002). Em um outro estudo, o mecanismo de RNAi foi utilizado para investigar a função do gene *hemilin* que codifica uma proteína de reconhecimento de padrões no inseto *Hyalophora cecropia*. Fêmeas que tiveram o gene *hemolin* silenciado depositaram ovos com embriões malformados, logo nenhuma larva emergiu desses ovos (BETTENCOURT et al., 2002). Em um terceiro estudo, foi demonstrado que o silenciamento do gene da aminopeptidase N do intestino médio mediado por dsRNA resulta em maior resistência das larvas de *Spodoptera litura* à proteína Cry1C, apontando, assim, para um papel funcional dessa proteína como receptor de proteínas Cry de *B. thuringiensis* (RAJAGOPAL et al., 2002).

Nos últimos anos, especial foco tem sido dado à utilização de RNAi como uma ferramenta promissora no auxílio ao controle de pragas (PRICE; GATEHOUSE, 2008). O mecanismo de ação baseado, principalmente, na introdução de um dsRNA em um organismo alvo, geralmente através de ingestão, inicia um processo de silenciamento gênico, através da degradação de mRNAs homólogos, causando diminuição na síntese da proteína correspondente, dificultando a sobrevivência ou até mesmo levando o organismo a morte (MEISTER; TUSCHL, 2004; KOLA et al., 2015).

Em lepidópteros, experimentos de RNAi mostraram resultados promissores em algumas espécies. Em *S. litura*, o silenciamento do gene do receptor de vitelogenina aumentou os níveis desta proteína na hemolinfa, diminuindo sua captação no ovário e impedindo a formação correta dos embriões (SHU et al., 2011). O gene que codifica a enzima diacilglicerol transferase, que catalisa o último passo da síntese de triacilgliceróis foi silenciado em *B. mori*, reduzindo a produção de feromônio sexual (DU et al., 2012). Neuropeptídeos de insetos como dopamina,

acetilcolina, alostatina e alatotropina também foram silenciados como estratégia para o controle de insetos (ABDEL-LATIEF; HOFFMAN, 2014). Estudos demonstraram que o silenciamento mediado por RNAi de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase em *H. armigera* inibiu a fecundidade das fêmeas afetando efetivamente a oviposição e reduzindo significativamente os níveis de transcritos da vitelogenina (WANG et al., 2013). Mortalidade significativa foi observada em *M. sexta* quando os insetos foram alimentados com dsRNA específico para o gene vATPase (WHYARD; SINGH; WONG, 2009). Plantas de tabaco transgênico que expressam o dsRNA contra o gene que codifica o receptor de ecdisona (EcR) de *H. armigera* apresentaram uma resistência significativa e as larvas apresentaram defeitos de muda e maior letalidade. Além disso, as plantas de tabaco transgênicas que expressam o dsRNA para EcR de *H. armigera* EcR também foram resistentes a outro lepdóptero, a praga da beterraba, *Spodoptera exigua*, devido à alta similaridade nas sequências nucleotídicas dos genes EcR dessas espécies (ZHU et al., 2012). Esses estudos fornecem evidências adicionais de que o silenciamento mediado por RNAi, seja ele através de abordagens transgênicas ou não transgênica, é capaz de melhorar a resistência a insetos praga.

A utilização desta estratégia exige, entretanto, a escolha de alvos que sejam eficazes contra o organismo alvo e, ao mesmo tempo, não apresente toxicidade e/ou alergenicidade em mamíferos, além de efeitos contra insetos não alvos (KOLA et al., 2015). Dessa forma, criar um banco de dados de sequências de DNA permite conhecer a composição gênica dos insetos, ajuda a identificar sequências expressas especificamente nos organismos alvos e a escolher a melhor região do gene a ser utilizada para o silenciamento, visando desenvolver um método de controle biotecnológico alternativo.

2. OBJETIVOS

2.2 Objetivo geral

Realizar o transcriptoma de *Helicoverpa armigera* visando a geração de dados acerca da biologia molecular deste organismo, interação com hospedeiros, bem como a avaliação de genes candidatos que codifiquem moléculas essenciais ao desenvolvimento do inseto, para uso no controle deste inseto-praga via silenciamento por RNA interferente.

2.3 Objetivos específicos

- Analisar o transcriptoma de lagartas de *H. armigera* alimentadas por folhas de algodão e de tabaco visando gerar informações sobre a expressão gênica e compreender os processos fisiológicos envolvidos nessa interação;
- Identificar e avaliar a expressão de um gene candidato com potencial para uso no controle específico de *H. armigera*, utilizando a tecnologia de RNAi para o silenciamento deste gene.

**CAPÍTULO I – MONTAGEM *DE NOVO* E ANÁLISE DO TRANSCRITOMA DE
LAGARTAS DE *Helicoverpa armigera* ALIMENTADAS COM ALGODÃO E
TABACO**

RESUMO

Helicoverpa armigera é um inseto polífono que se alimenta de muitas famílias de plantas hospedeiras e exibe uma grande capacidade de desenvolver resistência a inseticidas e efetivamente contornar a maioria das estratégias de manejo de pragas. Neste trabalho foram analisadas as diferenças no desempenho das lagartas frente à alimentação com duas plantas hospedeiras: algodão (*Gossypium hirsutum*) e tabaco (*Nicotiana benthamiana*). Inicialmente, foi monitorado o desenvolvimento da lagarta em cada planta hospedeira. Os resultados do bioensaio nas dietas sugeriram que a maioria das lagartas de *H. armigera* falhou em completar seu ciclo de vida em *N. benthamiana* e é suscetível aos efeitos deletérios da alimentação nessas plantas. Além disso, através de análises de RNAseq usando a plataforma Illumina, foram observados diferentes padrões de expressão gênica quando os insetos foram alimentados com as plantas hospedeiras, separadamente. Os dados de sequenciamento e expressão gênica demonstraram 1295 genes expressos diferencialmente por abordagem de sequenciamento *de novo*. Desses 1295 genes, 743 foram regulados positivamente e 552 genes foram regulados negativamente em insetos alimentados com tabaco, em referência às lagartas alimentadas com algodão. A fim de validar a biblioteca dos genes diferencialmente expressos, os níveis de expressão de 28 genes foram analisados por RT-qPCR. As respostas transcricionais às duas dietas nos insetos que chegaram à fase pupa destacaram principalmente a superexpressão de genes envolvidos na detoxificação e digestão. Tais diferenças na expressão entre genes relacionados às funções fisiológicas fornecem dados sobre os mecanismos de herbivoria de *H. armigera* frente aos hospedeiros estudados. Portanto, a análise do transcrito deste inseto é uma ferramenta no estudo dos mecanismos fisiológicos relacionados ao desempenho em diferentes hospedeiros e fornece informações acerca de possíveis genes potenciais para o desenvolvimento de métodos de controle mais sustentáveis.

Palavras-chave: Transcritoma, *Helicoverpa armigera*, herbivoria, digestão, detoxificação.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura é uma das principais bases da economia de países em desenvolvimento. No Brasil, ela é responsável pela geração direta e indireta de empregos, contribuindo de forma expressiva para o Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro (CEPEA/USP, 2018; EMBRAPA, 2018). As principais culturas que mais se destacam na agricultura brasileira são: algodão, café, cana-de-açúcar, feijão, milho e soja, entre outras (MAPA, 2017). Entretanto, o sistema de monocultura adotado para o cultivo dessas culturas, a exemplo o algodoeiro, favorece a incidência de pragas (GALLO et al., 2002). As perdas na colheita devido a essas pragas, principalmente insetos, constituem uma das restrições mais significativas para o aumento da produtividade (FERRY et al., 2004).

O algodoeiro, espécie *Gossypium hirsutum* L., é o principal fornecedor de fibras naturais no mundo e é uma importante fonte de commodities têxteis, farinhas e óleo (HAN et al., 2004; MEI et al., 2004). No mercado do algodão, o Brasil está inserido no bloco dos cinco maiores produtores mundiais, contribuindo com 6% dessa produção (ABAPA, 2018). Apesar destes números, a produção brasileira de algodão é limitada por vários fatores, dentre eles o aumento de custos direcionados ao controle de pragas, à mão-de-obra e aos fertilizantes. O efeito da infestação por insetos-praga seguido de infecção secundária pode levar a 80% de perda na produção de fibra de algodão (OERKE, 2006; ABRAPA, 2017). Cerca de 1326 espécies de insetos foram relatadas em todo o mundo como pragas do algodão e, entre elas, está a lagarta *Helicoverpa armigera*. A praga se alimenta e destrói diretamente o tecido de fibra em desenvolvimento dentro das cápsulas de algodão (DUA et al., 2006).

A *H. armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga encontrada em várias regiões do mundo, causando severos prejuízos em diversas culturas. No Brasil, essa importante praga agrícola foi constatada na safra 2012/2013, com registros de ocorrência nos estados da Bahia, Goiás e Mato Grosso (CZEPAK et al., 2013a). Esse inseto é considerado uma das principais pragas da ordem Lepidoptera devido à sua natureza polifágica, alta capacidade reprodutiva e rápida dispersão. As

perdas nas plantações de soja e algodão na safra 2012/2013 no Brasil foram estimadas em aproximadamente US\$ 500 milhões (SEAGRI, 2013).

Os métodos atuais amplamente aceitos e utilizados para o controle de *H. armigera* são a pulverização de inseticidas químicos e o uso de plantas transgênicas produtoras de toxinas *Bacillus thuringiensis* (Bt). No entanto, devido à extensa pulverização de inseticidas, essa praga desenvolveu resistência à maioria dos inseticidas utilizados (HECKEL, 2012; FATHIPOUR; SEDARATIAN, 2013). Ademais, o controle químico aumenta substancialmente os custos com insumos para a produção e é bastante oneroso e pode causar impactos negativos ao meio ambiente e geram riscos toxicológicos ao homem (MIRANDA, 2006; CHRISMAN et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014). O uso de plantas transgênicas que produzem toxinas Bt denota eficiência no controle de alguns insetos-praga, mas seu uso prolongado e grande área de cultivo levaram a casos esporádicos de desenvolvimento de resistência à toxina Bt (TABASHNIK et al., 2008; TABASHNIK; BREVAULT, 2013).

Os insetos herbívoros polifágicos, como a *H. armigera*, enfrentam desafios complexos durante a alimentação de suas plantas hospedeiras, pois as plantas se defendem contra a herbivoria de maneira constitutiva e induzida (KESSLER; BALDWIN, 2002). Além das barreiras físicas do hospedeiro, os insetos também precisam superar as respostas químicas das plantas, a exemplo os metabólitos secundários. Essas barreiras impostas pelas plantas são variáveis durante o seu ciclo de vida e também entre as espécies de plantas (LUKEFAHR; FRYXELL, 1967; WANG et al., 2005). Dessa forma, um inseto generalista, como a *H. armigera*, está exposto a uma variabilidade de nutrientes, barreiras físicas e químicas e precisam desenvolver mecanismos de defesa eficazes para a sua sobrevivência.

Nesse cenário, uma melhor compreensão da diversidade de respostas fisiológicas de inseto herbívoros na interação inseto-planta gerou interesse na comunidade científica para examinar estratégias alternativas visando o controle de insetos-praga. Assim, um número significativo de estudos transcritômicos de insetos tem se concentrado na análise de expressão gênica para uma melhor compreensão das interações patógeno-hospedeiro (VOGEL et al., 2014) e do desenvolvimento de resistência a inseticidas (PENG et al., 2011; AGUNBIADÉ et al., 2013), para a

identificação de genes envolvidos em processos de desenvolvimento (TANG et al., 2017), digestão, detoxificação e defesa (PAUCHET et al., 2010), dentre outros. Em *H. armigera*, os perfis transcricionais em resposta ao gossipol, um metabólito secundário do algodoeiro, também foram analisados, utilizando microarranjos e RNA-seq (Sequenciador Roche 454 FLX) (CELORIO-MANCERA et al., 2011). O sequenciamento de RNA (RNA-seq) usando plataformas de sequenciamento de alto rendimento oferece uma variedade de novas possibilidades, como o perfil transcricional de organismos que ainda não possuem o genoma sequenciado (MARTIN; WANG, 2011).

Dessa forma, o estudo do transcrito de insetos submetidos a diferentes fontes de alimentação tem sido empregado para compreender a plasticidade nas respostas transcricionais e para uso biotecnológico, e se tornou uma ferramenta efetiva na busca de moléculas candidatas para uso no controle de insetos-praga (FIRMINO et al., 2013; SPARKS et al., 2013; ROY et al., 2016). Este capítulo apresenta o perfil transcricional de *H. armigera*, utilizando RNA-seq, após alimentação com folhas de algodão (*G. hirsutum* L.) e de tabaco (*Nicotiana benthamiana*), além da análise de desenvolvimento desses insetos sob estas condições visando entender as respostas na interação *Helicoverpa*-algodão e *Helicoverpa*-tabaco.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Analisar o transcrito de lagartas de *H. armigera* alimentadas em folhas de algodão e de tabaco visando gerar informações sobre a expressão gênica e compreender os processos fisiológicos envolvidos nessa interação.

2.2 Objetivos específicos

- Gerar bibliotecas de *RNAseq* de insetos alimentados com folhas de algodão e tabaco por sequenciamento em larga-escala;
- Identificar os genes diferencialmente expressos mais representativos para as diferentes condições de alimentação avaliadas;
- Identificar e validar genes responsáveis pelos processos de digestão, biossíntese de metabólitos e mecanismos de detoxificação como potenciais candidatos para uso no controle do inseto;
- Avaliar a taxa de sobrevivência, tempo de desenvolvimento e peso das pupas alimentadas com folhas de algodão e tabaco;

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção dos insetos, bioensaio de alimentação e extração de RNA

Os insetos em fase pré-eclosão foram obtidos do Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília-DF. Lagartas de *H. armigera* recém eclodidas foram alimentadas em dieta artificial durante o primeiro instar até atingir o segundo instar de desenvolvimento. Neste estágio, os insetos foram ambientados individualmente em placas entomológicas (28 ± 2 °C de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 12:12 claro/escuro), onde foram alimentados com folhas de tabaco e algodão de 4 a 5 semanas de idade, cultivadas em casa de vegetação. Para cada dieta, 60 insetos foram utilizados e em cada placa foi adicionado um emplastro umedecido para evitar o ressecamento das folhas, que foram substituídas por folhas novas a cada 24 horas.

O desenvolvimento dos insetos em cada dieta foi avaliado diariamente, desde o segundo instar até a emergência dos adultos, por meio da anotação da mortalidade, tempo de permanência em cada estágio (2^o ao 6^o), tempo de pupação e peso das pupas, a fim de verificar a taxa de crescimento dependente das dietas. O experimento foi finalizado quando todos os insetos haviam emergido ou estavam mortos. Na fase de ovos pré-eclosão, os insetos foram colocados para infestação em folhas de algodão (*Gossypium hirsutum*) e tabaco (*Nicotiana benthamiana*). Os dados foram analisados estatisticamente pelo Sigma Plot 12 (Systat), utilizando o Teste de Shapiro-Wilk para normalidade, teste de variância igual para homogeneidade de variância e Teste t de Student para comparar as médias ($P < 0,05$).

O algodão constitui uma das principais plantas cultivadas no Brasil que têm sido atacadas pela *Helicoverpa armigera*, por isso foi escolhida como fonte de alimentação para o inseto, a fim de gerar dados que pudessem ser comparados com os efeitos da alimentação do inseto em planta-modelo para experimentos e que não constitui o nicho do inseto, motivo da escolha de plantas de tabaco.

O RNA total das lagartas inteiras de quinto ínstar de desenvolvimento foi extraído utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com DNase I RNase-free (Ambion, Invitrogen Life Sciences) de acordo com instruções do fabricante. Após etapa de limpeza em coluna do kit RNeasy Micro Kit (QIAGEN) e verificação da qualidade em gel de agarose, a concentração de RNA foi determinada em um fluorômetro Qubit, utilizando o kit Quant-iT RNA assay (Invitrogen Life Technologies). Em seguida, os RNAs de cada tratamento, separadamente e em pool equimolar, foram enviados para a síntese de cDNA e sequenciamento por síntese (paired-end) no Roy J. Carver Biotechnology Center/W.M. Keck Center da Universidade de Illinois em Urbana-Champaign, EUA.

3.2 Construção da biblioteca de cDNA e sequenciamento

O RNA total foi analisado em um Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, EUA) antes da purificação de RNA mensageiro (mRNA). Foram realizados dois experimentos (com as amostras em duplicata) de infestação de insetos nas plantas utilizadas, sendo geradas três bibliotecas de cDNA, sendo duas referentes ao cDNA das lagartas previamente alimentadas com folhas de algodão (cotton 1 e cotton 2) e tabaco (tobacco 1 e tobacco 2). A terceira biblioteca de cDNA, normalizada, foi gerada a partir do “pool” de RNA total dos dois grupos anteriores para facilitar a montagem das sequências e o alinhamento dos reads obtidos no sequenciamento das amostras, uma vez que a *H. armigera* não possuía o seu genoma sequenciado até o momento da montagem deste transcrito.

O RNA-Seq para a construção dessas bibliotecas foi realizado utilizando o Sistema Illumina HiSeq™ 2500 para a referente ao pool de amostras, com

sequenciamento *paired-end* com tamanho médio de reads de 160 pb e Illumina HiSeq™ 2000 para as bibliotecas de algodão e tabaco não normalizadas, com sequenciamento *paired-end* e tamanho de reads de 100 pb, ambos da Illumina (<http://www.illumina.com/>).

3.3 Pré-processamento das sequencias

Os dados brutos provenientes do sequenciamento foram inicialmente analisados usando a ferramenta FastQC versão 0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), uma ferramenta de controle de qualidade de dados de sequencias de alto rendimento, a fim de diagnosticar qualquer erro relacionado à construção ou ao sequenciamento das bibliotecas (ANDREWS et al., 2012). Em seguida, os reads foram processados utilizando o software Trimmomatic versão 0.33 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) para a eliminação de sequencias de baixa qualidade e adaptadores do sistema Illumina utilizados durante o sequenciamento (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Os parâmetros utilizados para a eliminação de reads de baixa qualidade consistiram no valor de Phred < 28 para todas as bibliotecas; comprimento < 86 pb para as bibliotecas de algodão e tabaco e <146 para a biblioteca referência. Os dados processados das três bibliotecas foram normalizados *in silico* com o auxílio do pacote de softwares KHMER versão 2.0 (<http://khmer.readthedocs.io/en/v2.1.1/>) (CRUSOE et al., 2015). Em seguida, os *reads* remanescentes deste processamento inicial foram utilizados para posterior montagem *de novo* do transcrito utilizando as ferramentas do software TRINITY (HAAS et al., 2013).

3.4 Montagem dos contigs, anotação e ontologia gênica

Os *reads* foram montados utilizando o software Trinity (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>), seguindo a metodologia *de novo*, utilizando os parâmetros padrão do programa (HAAS et al., 2013). A montagem foi

realizada por meio da união de todas as bibliotecas previamente processadas, gerando um único arquivo em formatação fasta (.fa), contendo todas as sequências consenso (contigs). Em seguida, esses contigs foram agrupados em função da similaridade dos fragmentos de cDNA (EST: expressed sequence tag), e designados como unigenes (contigs únicos).

Após a montagem, foi realizada uma busca por homologia usando o banco de dados não redundante (nr) para proteínas, do NCBI, a fim de identificar ORFs preditas nas sequências montadas. Tanto os contigs que não apresentaram sequência homóloga reportada no banco de dados nr, quanto àqueles que apresentaram homologia com microrganismos ou plantas unicamente, foram retirados da montagem, com a finalidade de obter uma análise de expressão diferencial mais acurada.

Os contigs componentes do transcrito de *Helicoverpa armigera* foram anotados com o auxílio da ferramenta BLAST2GO software suite v4.1.9 (CONESA et al., 2005) utilizando a ferramenta BLASTX contra o banco de dados de sequências de proteínas não redundantes (nr) do NCBI (National Center for Biotechnology Information), sendo consideradas as anotações com valor de *e* (e-value) máximo de 10^{-5} . Após o BLAST, as sequências contaminantes (DNA de procariotos, de vírus, de fungos, de plantas e sequências de vetores) foram removidas com a finalidade de obter um transcrito mais confiável para as próximas análises.

As buscas por homologia de sequências únicas e anotação funcional por termos de ontologia gênica (GO; www.geneontology.org) e códigos de classificação enzimática foram determinadas utilizando o software Blast2GO v4.3 Basic (www.blast2go.org). Para tanto, o banco de dados de proteínas do InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) e o banco de dados de vias metabólicas KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <http://www.genome.jp/kegg/>) foram utilizados. Adicionalmente, com o objetivo de avaliar a completude, ou seja, o quão completo e representativo está o transcrito, foi utilizado o programa BUSCO (do inglês “Biolmarking Universal Single-Copy Orthologs) v3 (<http://busco.ezlab.org/>) (SIMÃO et al., 2015).

3.5 Análises de Expressão Diferencial

Após a montagem do transcrito, as bibliotecas processadas para as condições de alimentação em algodão e tabaco foram submetidas à análise de expressão diferencial *in silico* dos transcritos, seguindo o *pipeline* do Trinity versão 2.0.6 (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki/Trinity-Differential-Expression>). Esta etapa consiste, resumidamente, de três fases: mapeamento dos *reads*, abundância de transcritos e análise estatística. Inicialmente, as bibliotecas não normalizadas do inseto foram mapeadas e contadas no transcrito referência seguindo uma estimativa de abundância usando o software RSEM com parâmetros padronizados pelo software (LI; DEWEY, 2011). A análise estatística e quantificação da expressão dos genes foi feita com software EdgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010) em uma matriz contendo as estimativas de abundância do RSEM (número de fragmentos RNA-seq mapeados para cada transcrito em cada amostra) utilizando valores de FDR (False Discovery Rate) com valor de $p < 0,05$ e fold change ≥ 2 . Os transcritos expressos diferencialmente foram agrupados de acordo com seus padrões de expressão e ilustrados em “mapas de calor” (*Heatmaps*) representando a expressão dos genes diferencialmente expressos. Tais mapas foram elaborados com o software ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) (METSALU; VILO, 2015), cuja escala de expressão foi determinada pelos valores de FPKM (*Fragments per Kilobase per Milion of Reads*) normalizados pelo EdgeR.

3.6 Enriquecimento dos Termos de Ontologia Gênica (GO)

A fim de identificar quais termos de GO estavam estatisticamente enriquecidos no conjunto de genes diferencialmente expressos, foi realizada a análise de enriquecimento desses termos GO (*GO Enrichment analysis*) utilizando o pacote de programas FUNC para esta análise, seguindo os parâmetros padrão do software (PRÜFER et al., 2007). Em seguida, os termos enriquecidos obtidos após análise foram filtrados com a finalidade de eliminar as redundâncias que originassem erros de interpretação dos dados. O processo de filtragem foi realizado usando a

ferramenta REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>), com similaridade permitida de 0,5 entre os termos analisados.

3.7 Normalização de genes referência e Validação do transcrito

A fim de avaliar a expressão de genes para a normalização das condições experimentais, bem como confirmar a expressão de genes diferencialmente expressos no transcrito, foi utilizada a técnica de RT-qPCR. Para tanto, as amostras de RNA total (2 µg) extraídas de lagartas inteiras de quinto ínstar foram utilizadas para síntese de cDNA utilizando o kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™), de acordo com as instruções do fabricante. Os *primers*, específicos para cada gene escolhido para a normalização das condições de expressão gênica, utilizados para a RT-qPCR estão listados na tabela 1. Os *primers* referentes aos genes escolhidos para a validação do transcrito estão listados na tabela 2. Cada reação de RT-qPCR foi feita com volume final de 10 µL, sendo 5,0 µL de GoTaq® qPCR Master Mix 2X (Promega), 2,6 µL de água livre de nucleases (Promega), 0,2 µL de cada primer (direto e reverso - ambos na concentração inicial de 10 µM) e 2,0 µL de cDNA diluído 20 vezes.

A RT-qPCR foi realizada no termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems, EUA) utilizando o seguinte programa: 95 °C 20 s., seguido de 40 ciclos de 95 °C por 3 s e 60 °C por 30 s. Ao final de 40 ciclos, foi feita uma curva de dissociação para cada fragmento amplificado (60 - 95°C, a cada 0,5 °C por 1 s) para verificar a possível formação de dímeros de *primer* ou contaminação da amostra. As reações de RT-qPCR foram feitas em triplicata e controles negativos contendo água em vez de cDNA foram incluídos para verificar presença de contaminantes nas amostras.

Os níveis de expressão foram determinados como o número de ciclos necessários para alcançar um limite fixo na fase exponencial da PCR. O número de ciclos, referido como valor de Ct (threshold cycle), foi utilizado para determinação da expressão relativa de cada gene em cada amostra.

Tabela 1. Lista de *primers* para a amplificação dos genes de referência utilizados na normalização das condições de expressão dos genes de *H. armigera* em condições de alimentação com tabaco e algodão.

Gene Referência	Primer	Sequencia (5' – 3')
<i>Elongation factor 1 alfa</i>	HarmEF1 α _qPCR_Fw	AGGAAATGGGTAAGGGTTCCT
	HarmEF1 α _qPCR_Rv	AGTATTTGGCGGTTTCGAACT
<i>Ribosomal Protein S18</i>	HarmRPS18_qPCR_Fw	CAGGCAATACAAAATCCCAGA
	HarmRPS18_qPCR_Rv	ACGGATCTTCTTCAGCCTTTC
<i>Succinate Dehydrogenase</i>	HarmSDH_qPCR_Fw	TACAGACCCGTTATCGACCAG
	HarmSDH_qPCR_Rv	GCACCCGTGTTGAGAAAATTA
β Actin	Harm β Act_qPCR_Fw	CGCTGCCCTATAAAAGATTCC
	Harm β Act_qPCR_Rv	GAGCCATTGTGCGACTACAAGC
<i>Ribosomal Protein S13</i>	HarmRPS13_qPCR_Fw	ATTCAGGCTGATTCTCGTTGA
	HarmRPS13_qPCR_Rv	CTTAAGCCACCAGAGCAGATG
<i>Gliceraldehyde 3P Dehydrogenase</i>	HarmGAPDH_qPCR_Fw	AGGTCATCCATGACAACCTCG
	HarmGAPDH_qPCR_Rv	CACAGTTTACCAGAGGGTCCA
<i>Ubiquitin</i>	HarmUBCE_qPCR_Fw	GAGATTAACCTCCCCGCAGAG
	HarmUBCE_qPCR_Rv	AATAATTGGCAGGCACACTTG
β Tubulin	Harm β TUB_qPCR_Fw	TCCAAGGTTTCCAACCTCACAC
	Harm β TUB_qPCR_Rv	ACTTTGGGCGAAGGTACAACCT

Tabela 2. Lista de *primers* referentes aos genes escolhidos para a validação do transcrito de *H. armigera* em condições de alimentação com tabaco e algodão.

Genes Validados	Primer	Sequencia (5' – 3')
Genes superexpressos em tabaco		
<i>Chymotrypsin-like protease</i>	HarmCHYM_qPCR_Fw	AGAGATTTCGCATAGCCGAGTT
	HarmCHYM_qPCR_Rv	GGCCAAGGGGTAAATTAATCA
<i>Astacin-like metalloprotease toxin 5</i>	HarmAMT_qPCR_Fw	AGCAGTACGCTGGAGTAGCAG
	HarmAMT_qPCR_Rv	GGCGTGAGTGAACCTCATTGTT
<i>Serine protease 52</i>	HarmSP52_qPCR_Fw	CAACCAAGAAGAGTGCAGGAG
	HarmSP52_qPCR_Rv	GGACTCCATTGTGGTAGAGAGG
<i>Midgut carboxypeptidase</i>	HarmMDCP_qPCR_Fw	CTTCGACCAGTACGGAGACAG
	HarmMDCP_qPCR_Rv	CTCCCACCAAATGAACTAGCA
<i>Serine protease 63</i>	HarmSP63_qPCR_Fw	GCTTCAGGAGCCATCACTACA
	HarmSP63_qPCR_Rv	GGATGATTGCAAGATCAGGAA

<i>Chymotrypsin precursor</i>	HarmPCHYM_qPCR_Fw HarmPCHYM_qPCR_Rv	TTGATCGGTGTGACCTCTTTC TTCAAAGACGTTGGTTGATCC
<i>Transmembrane protease serine 9</i>	HarmTPS9_qPCR_Fw HarmTPS9_qPCR_Rv	TGTTTAATCAGGAAGCCCTCA TCCTTGCCATTTCCATGTTG
<i>Zinc carboxypeptidase</i>	HarmZnCP_qPCR_Fw HarmZnCP_qPCR_Rv	TTCCACTCGTACTCCCAAATG CCTCTGACTGCAATCTCGAAC
<i>Cytochrome p450 CYP6ae19</i>	HarmCYP6ae_qPCR_Fw HarmCYP6ae_qPCR_Rv	CCCATTCTCGTTCCAACCTGA ACTTGCATTTTCGCGAACCTC
<i>Cytochrome p450 CYP6K1</i>	HarmCYP6K_qPCR_Fw HarmCYP6K_qPCR_Rv	GCGTCCTGATAGGTTCAACAA GTAGCGTTTACCCATGCAGAA
<i>Gossypol-induced cytochrome p450</i>	HarmGCYP_qPCR_Fw HarmGCYP_qPCR_Rv	TGTAGAAGCGTGCTTTGATGA CCTTCAATCCAGAAGGGAAAG
<i>Cytochrome p450 4g15</i>	HarmCYP4g15_qPCR_Fw HarmCYP4g15_qPCR_Rv	TACCAACAACACTACACGCTCCC TGTCAGGGTTGAAGGTGTCAG
<i>Cytochrome p450 4g9</i>	HarmCYP4g9_qPCR_Fw HarmCYP4g9_qPCR_Rv	TTGAGCGTGTGATCCTCGAAA GGGAGCGTGTAGTTGTTGGTA
<i>Odorant degrading enzyme CXE3</i>	HarmODE_qPCR_Fw HarmODE_qPCR_Rv	TGCCCATTTGGATGACCTGAT GTGCACGCCAGTTGAATCAAT

Genes subexpressos em Tabaco

<i>Serine proteinase inhibitor 1</i>	HarmSPI1_qPCR_Fw HarmSPI1_qPCR_Rv	CCAGCAGTTTTGAGAAAGGCC GAGCTTGTCTGGAGTGAACA
<i>Serine proteinase inhibitor 2</i>	HarmSPI2_qPCR_Fw HarmSPI2_qPCR_Rv	CCAGGGAGCCAAGATGTCTG CGTAGACAAACGGTTCGCATC
<i>Inducible metalloproteinase inhibitor</i>	HarmIMPI_qPCR_Fw HarmIMPI_qPCR_Rv	CGCAGTCAACGGAATGTTTCAG TCGTCACAATAACAGCCGTCA
<i>Immune reactive protease inhibitor</i>	HarmIRPI_qPCR_Fw HarmIRPI_qPCR_Rv	TGTGACGAAGGCTATGCAAGA TATTGCATTGGACACCGTGGA
<i>Protease inhibitor 4</i>	HarmPI4_qPCR_Fw HarmPI4_qPCR_Rv	TTGCCCTGTCTGATTGTACCC TGGTCGCAGTTGGAAGTGTA
<i>Leucine-rich repeat- protein 68</i>	HarmLRR_qPCR_Fw HarmLRR_qPCR_Rv	TACGCCTAGGGACATTCCTGA TAGTTAAAGGGCACGGCTTGT
<i>Fatty acid binding protein</i>	HarmFABP_qPCR_Fw HarmFABP_qPCR_Rv	GACTGCAAGACCACCTACA TCTCGTTGCCAGAGAACTTCC
<i>Pancreatic lipase-related protein 2</i>	HarmPLP2_qPCR_Fw HarmPLP2_qPCR_Rv	CGTGCGTCACAACCATTTGAT TGTTACGATGGCATTACCCA
<i>Chitin deacetylase 2</i>	HarmCDA2_qPCR_Fw HarmCDA2_qPCR_Rv	CTGCCCTGAAGGAAAATTAGC AGGGGCTCTGTTAGGATCAAC
<i>Chitinase A</i>	HarmCHIT_qPCR_Fw	CCTAGTACAGCCAAGCCAACA

	HarmCHIT_qPCR_Rv	CTCACAGCGATGTCATTCTCA
<i>Molting carboxypeptidase a</i>	HarmMCP_qPCR_Fw	CTGGCGTAAGAACAGGAGAGG
	HarmMCP_qPCR_Rv	CGCGGTAGATTTCACTGCATG
<i>Juvenile horm acid methyltransferase</i>	HarmJHAM_qPCR_Fw	ACAAGTTGCTCGGCTGTGATA
	HarmJHAM_qPCR_Rv	GGCAGGTCTCCCTCAATATCG
<i>Cytochrome Cyp338a2</i>	HarmCYP338_qPCR_Fw	GGGGAGCCTTCAAACAAAACC
	HarmCYP338_qPCR_Rv	CACGTCAGAGTGAGGCTTCTT
<i>Cytochrome Cyp6B6</i>	HarmCYP6B6_qPCR_Fw	CTCTGCATAACGACCCCAAGT
	Harm CYP6B6_qPCR_Rv	GCTCTGGGTCCTAGTCCAAAC

4 RESULTADOS

4.1 Desempenho larval em folhas de tabaco versus algodão

O desenvolvimento das lagartas de *H. armigera* sob alimentação em tabaco e algodão foi avaliado frente aos parâmetros mortalidade, tempo decorrido até a pupação e peso das pupas.

O experimento de alimentação em folhas de tabaco e algodão foi realizado com lagartas no 2º estágio de desenvolvimento, considerando que houve mortalidade de 100% para todos os insetos recém eclodidos que foram alimentados em folhas de tabaco, inviabilizando a continuidade do experimento. A *H. armigera* se desenvolve bem em plantas de algodão, sendo considerado, neste trabalho, o hospedeiro padrão de herbivoria.

No 3º estágio de vida quase 50% de todas as lagartas alimentadas por tabaco haviam morrido e esse índice aumentou para 70% no estágio seguinte, mostrando os efeitos deletérios da alimentação nestas folhas ainda no início do desenvolvimento do inseto. Em contrapartida, os insetos alimentados por folhas de algodão ainda apresentavam cerca de 90% de sobrevivência até o 4º estágio de desenvolvimento (figura 1A).

A partir do 4º estágio até a fase pupa, houve decréscimo na taxa de sobrevivência do grupo alimentado com algodão, perfazendo, ao final do experimento, cerca de 35% de sobrevivência. No grupo tabaco, quando os insetos atingiram o 5º estágio, a taxa de sobrevivência foi em torno de 10% e se manteve até a fase pupa.

Os efeitos da dieta em tabaco também foram pronunciados em relação ao tempo de desenvolvimento do inseto em dias, conforme demonstrado na figura 1B, cujo tempo médio do ciclo de vida foi de 25 dias na dieta em folhas de tabaco, a partir do 2º estágio até a fase pupa. Esse resultado diferiu significativamente do tempo médio de 20 dias da dieta em algodão, o que corrobora o retardo no crescimento larval decorrente da alimentação.

Apenas 10% das lagartas alimentadas em folhas de tabaco conseguiu atingir a fase pupa. A média de peso das pupas sobreviventes foi de 140 mg, significativamente inferior à média de peso observada para o grupo alimentado com algodão, que resultou em 180 mg, conforme demonstrado na figura 1C.

Não houve diferença entre os aspectos fenotípicos visíveis nas pupas sobreviventes dos dois tratamentos, mas as diferenças de peso entre os grupos reforçam as dificuldades de crescimento das lagartas em folhas de *Nicotiana benthamiana* em detrimento da alimentação em hospedeiro padrão.

4.2 Obtenção do RNA total

As amostras de RNA total de lagartas de *H. armigera* em quinto estágio (ínstar) de desenvolvimento alimentadas isoladamente com folhas de tabaco ou algodão apresentaram qualidade e integridade satisfatórias para as análises posteriores, quando visualizadas em gel de agarose 1% após a purificação, conforme ilustrado na figura 2. A integridade do RNA ribossômico, representado no gel pelas bandas mais abundantes, reflete a qualidade dos outros tipos de RNA, como o RNA mensageiro, biomolécula de interesse para os experimentos seguintes.

(WINNEBECK; MILLAR; WARMAN, 2010). A eletroforese em gel de agarose é essencial para uma avaliação prévia das amostras antes da síntese de cDNA.

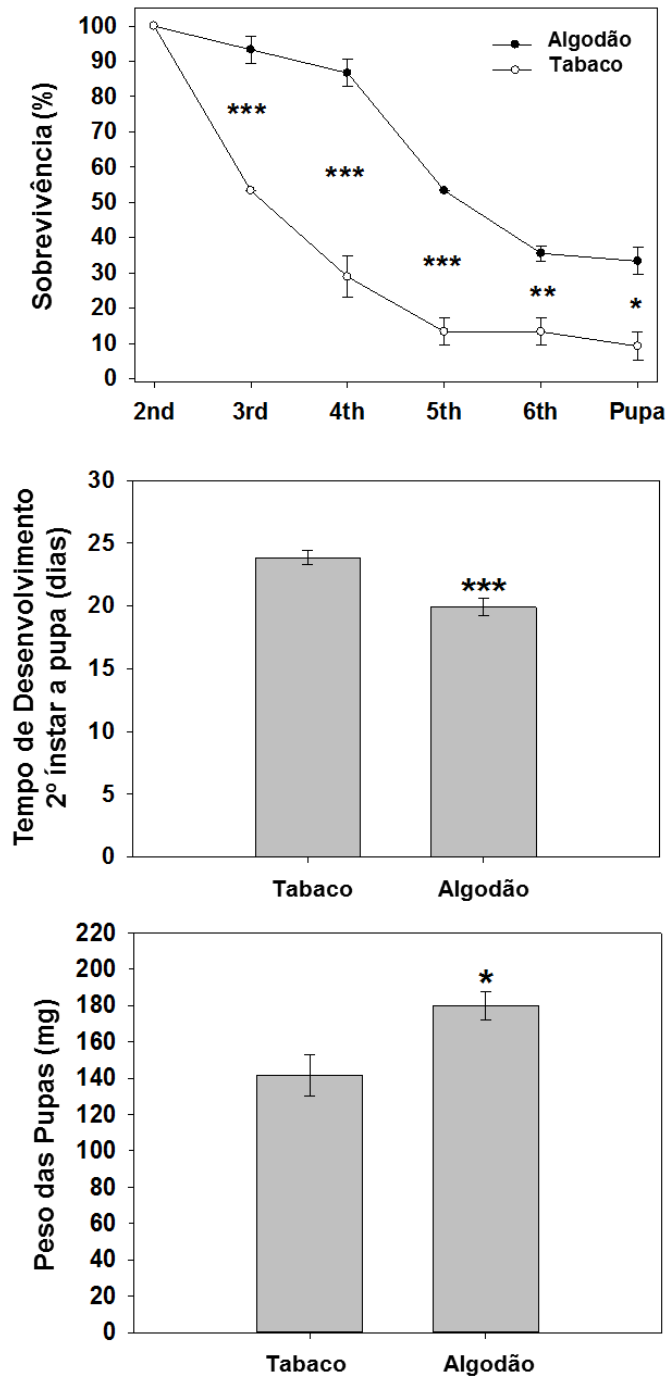


Figura 1. Sobrevivência e desempenho alimentar de larvas de *Helicoverpa armigera* alimentadas com folhas de algodão (*Gossypium hirsutum*) e tabaco (*Nicotiana benthamiana*). A) Porcentagem de sobrevivência dos insetos do 2º ínstar a pupa; B) Tempo

até a pupação (em dias); C) Média de peso das pupas dos insetos de ambos os tratamentos (em miligramas). Os dados foram analisados com o teste T de Student (* P <0,05; * P <0,01; ** P <0,001).

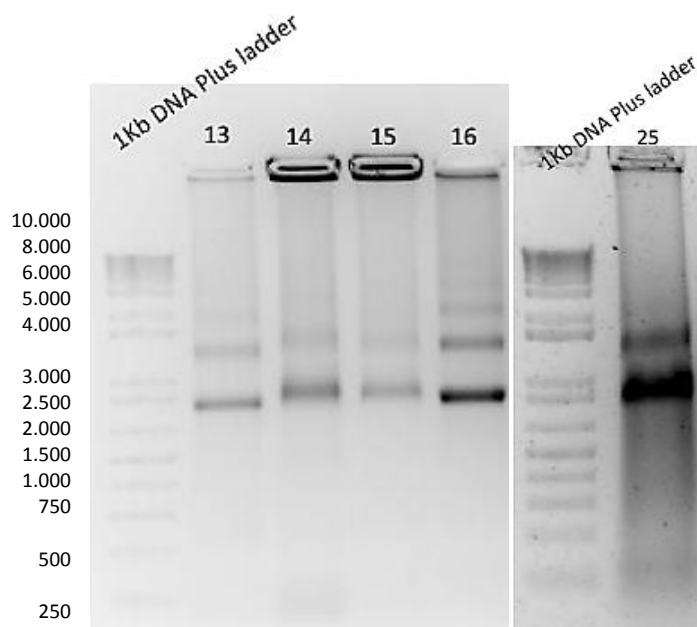


Figura 2. RNA total de lagartas quinto ínstar de *H.armigera* em gel de agarose 1% enviado para sequenciamento. Nos dois géis foram utilizadas alíquotas do marcador *1 Kb DNA Plus ladder* (Invitrogen); As amostras **13 e 14** representam o RNA de Insetos alimentados com folhas de tabaco; **15 e 16** – RNA de Insetos alimentados com folhas de algodão. A amostra **25** representa a integridade do RNA correspondente ao *pool* de amostras de RNA das condições anteriores que foi utilizada para a montagem da biblioteca referência.

4.3 Sequenciamento e pré-processamento dos dados

Após o sequenciamento foram geradas cinco bibliotecas: duas de lagartas alimentadas por folhas de algodão (*HaC1* e *HaC2*) e duas de lagartas alimentadas por folhas de tabaco (*HaT1* e *HaT2*), a partir das amostras de RNA oriundas dessas respectivas condições de tratamento. A quinta biblioteca representa o *pool* equimolar de RNA das amostras anteriores e foi denominada biblioteca de cDNA referência. Foi obtido um total de aproximadamente $11,2 \times 10^9$ bases e 112 milhões de *reads* pareados (*paired reads*), que variaram entre 18 milhões de *reads* para a menor

biblioteca e 22 milhões de *reads* para a maior biblioteca. A biblioteca de cDNA referência, por se tratar de uma combinação da quantidade de RNA resultante das amostras anteriores, apresentou uma quantidade de 56,2 milhões de *reads*, quantidade consideravelmente superior quando comparada com as demais bibliotecas.

Considerando a cobertura das sequências gerada pelas bibliotecas de RNA sequenciadas, foi realizada uma montagem *de novo* do transcrito com base em uma referência/transcritoma dos tecidos de *H. armigera* com a finalidade de obter uma análise de expressão diferencial de alta restringência e maior acurácia. Após as análises de pré-processamento, os *reads* de alta qualidade da biblioteca referência, que somaram em 39.627.827, foram normalizados e utilizados para a montagem dos *contigs* do transcrito. Os *reads* das bibliotecas de algodão e tabaco foram também normalizados para análises posteriores. A diferença observada no número de *reads* antes e após o pré-processamento demonstra a alta restringência utilizada no pré-processamento, reduzindo bastante a quantidade de *reads* utilizados para a montagem dos *contigs*. Os *reads* que não foram utilizados para a montagem dos *contigs* apresentaram má qualidade de sequenciamento ou insuficiência de cobertura de acordo com os parâmetros utilizados. O número de bases, o número inicial de *reads* e o número de *reads* para cada biblioteca após o pré-processamento estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Pré-processamento de todas as sequencias antes da montagem do transcrito de *H. armigera*

Pré-processamento dos dados	
Número de reads antes do pré-processamento	112.554.650
Número de bases antes do pré-processamento	11.255.465.000
Tamanho dos reads antes do pré-processamento (pb)	100
Número de reads após pré-processamento	79.255.654
Número de bases após pré-processamento	6.815.986.244

4.4 Montagem e anotação do transcrito

A montagem *de novo* do transcrito foi realizada com a ferramenta da plataforma TRINITY (HAAS *et al.*, 2013) utilizando 39.627.827 *reads* de alta qualidade que resultaram em 133.218 *contigs*. Após a montagem, os *contigs* foram submetidos às buscas por homologia contra o banco de dados de proteínas não redundantes (nr) do NCBI com a ferramenta BLASTx e *e-value* máximo de 10^{-5} utilizando o BLAST2GO, visando a obtenção de uma biblioteca bastante representativa. Dos 133.218, cerca de 66.780 (50,13%) *contigs* apresentaram pelo menos um hit contra o banco de dados nr, sendo que os outros 66.438 (49,87%) *contigs* podem corresponder provavelmente às sequências de RNA *ribosomal* (rRNA), RNA não-codificante (ncRNA - “*non-coding RNA*”), ou RNA codificante para proteínas não conhecidas ou não reportadas nos bancos de dados do NCBI (figura 3A).

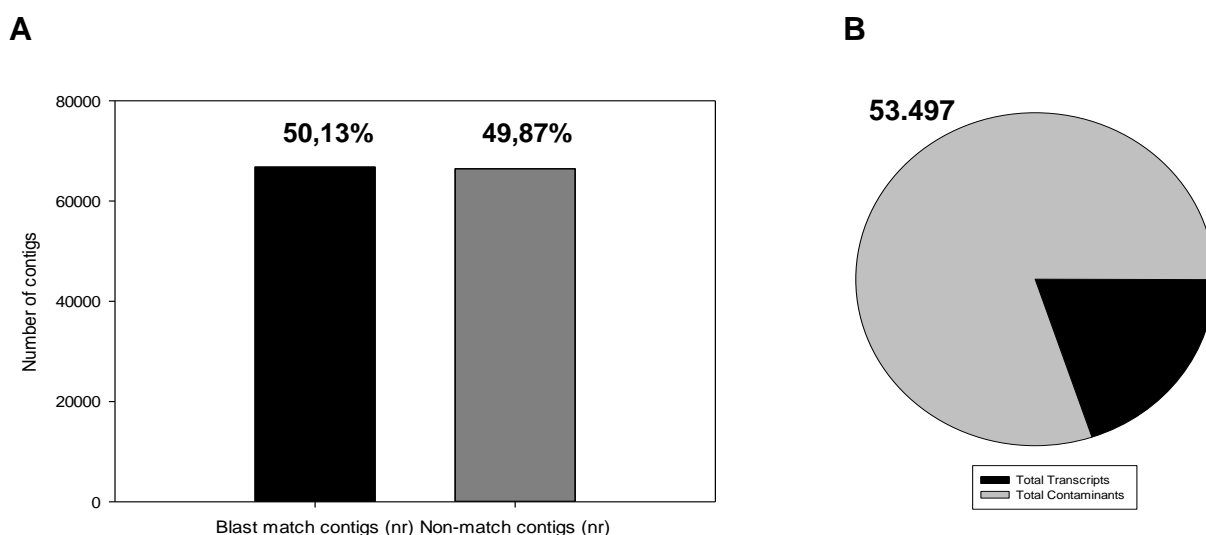


Figura 3. Quantidade de *contigs* resultantes da montagem e anotação do transcrito. A) Quantidade de *contigs* anotadas e não anotadas após o alinhamento utilizando a ferramenta

BLASTX. B) Quantidade de *contigs* resultantes após a retirada de sequências contaminantes.

Os *contigs* não anotados e os *contigs* detectados como contaminantes (sequências que apresentaram homologia unicamente com sequências de procariotos, vírus, parasitos e plantas) foram removidos para obtenção do transcrito de *H. armigera*. Dentre as sequências selecionadas após a análise do BLAST, aproximadamente 19,9% foram detectadas como contaminantes que representam 13.283 sequências (figura 3B). A etapa de identificação dessas sequências é necessária, uma vez que a montagem não foi feita com base em um genoma de referência, o que dificulta a detecção de sequências exógenas, provavelmente não presentes no genoma de *H. armigera*. A quantidade de sequências contaminantes justifica-se pela utilização de toda a carcaça do inseto para o sequenciamento. Além disso, mesmo sendo utilizados insetos mantidos em condições de laboratório, as plantas utilizadas para a alimentação estavam ambientadas em casas de vegetação o que interfere na mudança da microbiota do inseto e identificação de sequências de microrganismos e plantas após a anotação gênica.

O transcrito de *H. armigera* resultou em 53.497 *contigs* (figura 3B), e 23.022 unigenes, sendo o tamanho médio observado de 1563,05 pb para os *contigs* e 1417,43 para os unigenes. O tamanho mínimo dos *contigs* observados foi de 300 pb e o tamanho máximo de 24.150 pb, com uma média de cobertura de um *read* por *contig* de 50 e um N50 de 2.329 pb para os *contigs* e 2393 para os unigenes (tabela 4). Nossos dados mostram 5.936 genes a mais quando comparados aos 17.086 genes codificadores de proteínas previstos no genoma disponível de *H. armigera* (PEARCE et al., 2017). Um número maior de unigenes (> 50.000) foi relatado em outros transcritos de tecido específicos de *H. armigera* (ZHANG et al., 2015; YUAN et al., 2018), embora essa variabilidade seja fortemente afetada pelas condições de sequenciamento.

A qualidade de transcritos pode ser também avaliada utilizando as métricas do *software* BUSCO. O BUSCO é uma medida quantitativa da completude de montagem e anotação que se baseia em informações evolutivas presentes no conteúdo gênico (SIMÃO et al., 2015). Para essa análise foi utilizado um conjunto de

1.066 BUSCO's, os quais são grupos de genes constitutivos com frequência, relacionada à história evolutiva, testada a partir de modelos matemáticos, com o objetivo de serem usados como indicadores da completude de um determinado genoma ou transcrito (SIMÃO *et al.*, 2015).

A completude do transcrito de *H. armigera* foi de aproximadamente 88,7% apresentando uma qualidade alta segundo as métricas do *software*. Os genes "completos" encontrados com mais de uma cópia dentro do transcrito foram 585 e são classificados como "duplicados", representando 54,87% das sequências avaliadas, conforme ilustrado na tabela 4.

Tabela 4. Montagem e completude do transcrito de *H. armigera*

Assembly statistic	Pre-filtered assembly		Post-filtered assembly	
	Contigs	Unigenes	Contigs	Unigenes
Number of Unigenes	75465		23022	
Number of Contigs	133218		53497	
GC %	40.02		42.64	
Completed BUSCOs			945 (88.7 %)	
Single copy BUSCOs			360 (33.77 %)	
Duplicated BUSCOs			585 (54.87 %)	
Contigs	Contigs	Unigenes	Contigs	Unigenes
Median (bp)	643	492	1107	798
Mean (bp)	1124.15	884.12	1563.05	1417.43
Total assembled bases:	149757343	66720147	83618654	32632122
Contig N10 (bp)	4887	4954	5424	5997
Contig N30 (bp)	2849	2566	3434	3648
Contig N50 (bp)	1769	1296	2329	2393

Após as análises de anotação utilizando a ferramenta BLASTx, foi observada maior similaridade dos *contigs* com sequências de insetos, sendo que a melhor distribuição de espécies atingidas pertence a ordem Lepidoptera: *Amyelois transitella* (21,6% de similaridade entre as sequências) e *Bombyx mori* (19,8%), o bicho-da-seda. Além destes insetos foi observada similaridade com sequências de outros insetos lepidópteros, como *Papilio xuthus*, *Papilio machaon*, *Danaus plexippus*, *Operophtera brumata*, *Papilio polytes*, *Plutella xylostella* e *Spodoptera litura* conforme demonstrado na figura 4. Provavelmente, o maior nível de similaridade com *Amyelois transitella* e *Bombyx mori* relaciona-se com a completude do genoma desses organismos, além de possível conservação das sequências genômicas entre o inseto em estudo e esses organismos, haja vista pertencerem à mesma ordem (CHANG; SHEN, 2016; XIA *et al.*, 2004). Os dados obtidos demonstraram baixa similaridade com sequências de *H. armigera* (5,8%) já depositadas nos bancos de dados uma vez que a montagem deste transcrito não foi guiada por genoma.

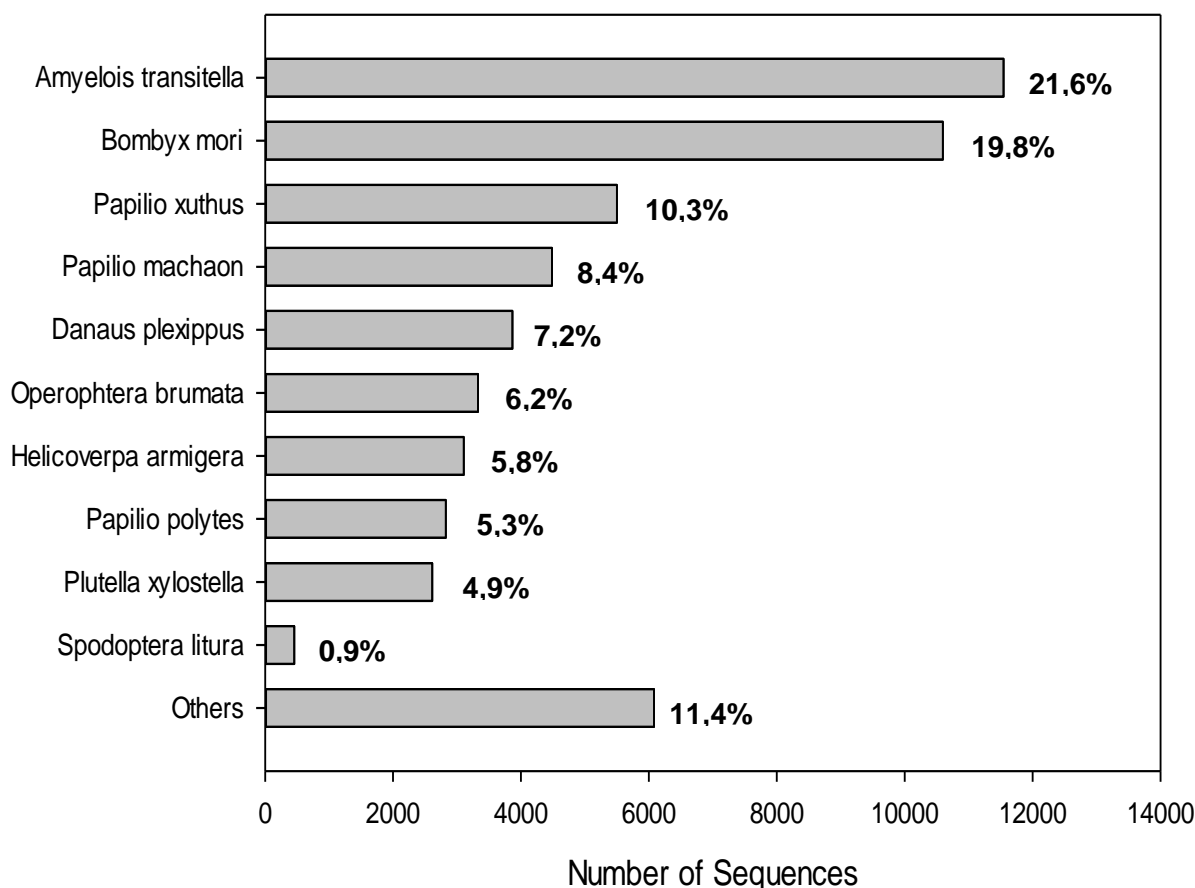


Figura 4. Comparação das sequencias do transcrito de *H. armigera* com outras espécies de insetos a partir da distribuição de BLASTx contra o banco de dados de proteína NR (*non-redundant*) do NCBI.

4.5 Ontologia Gênica (GO) e Análise de Vias Metabólicas

A classificação funcional dos *contigs* do transcrito de *H. armigera* foi realizada por análise de ontologia gênica associada aos dados do *InterPro* utilizando o BLAST2GO (CONESA; GOTZ, 2008; CONESA et al., 2005).

As buscas realizadas resultaram em 36.501 (60,45%) dos *contigs* anotados em termos de ontologia gênica que foram agrupados em três categorias: processos biológicos, função molecular e componente celular (figura 5). Os termos dominantes para a categoria processos biológicos são genes associados a processos metabólicos e celulares, enquanto os termos dominantes para função molecular são atividade catalítica e de ligação. Em relação à categoria componente celular, os termos dominantes são os genes associados à membrana.

Com base na anotação foram geradas informações acerca das famílias de proteínas mais abundantes identificadas no transcrito, conforme ilustrado na figura 6. A maior parte dos *contigs* do transcrito de *H. armigera* corresponde às famílias de proteínas do complexo citocromo P450, proteínas transportadoras de membrana, proteases, desidrogenases/redutases, proteínas envolvidas com a cutícula do inseto, GTPases, triacilglicerol lipases e citocromo P450 classe E, que juntas perfazem 2869 sequencias.

Os genes codificantes de enzimas foram agrupados de acordo com a funcionalidade biológica que exercem em diferentes mecanismos e vias metabólicas, aos quais estão envolvidos, com base na análise do *software KEGG*, ilustrada na figura 7. A maior parte das sequencias identificadas corresponde às enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, metabolismo e biodegradação de xenobióticos, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de nucleotídeos,

metabolismo de cofatores e vitaminas, metabolismo de lipídios, biossíntese de antibióticos, metabolismo energético, dentre outras vias metabólicas.

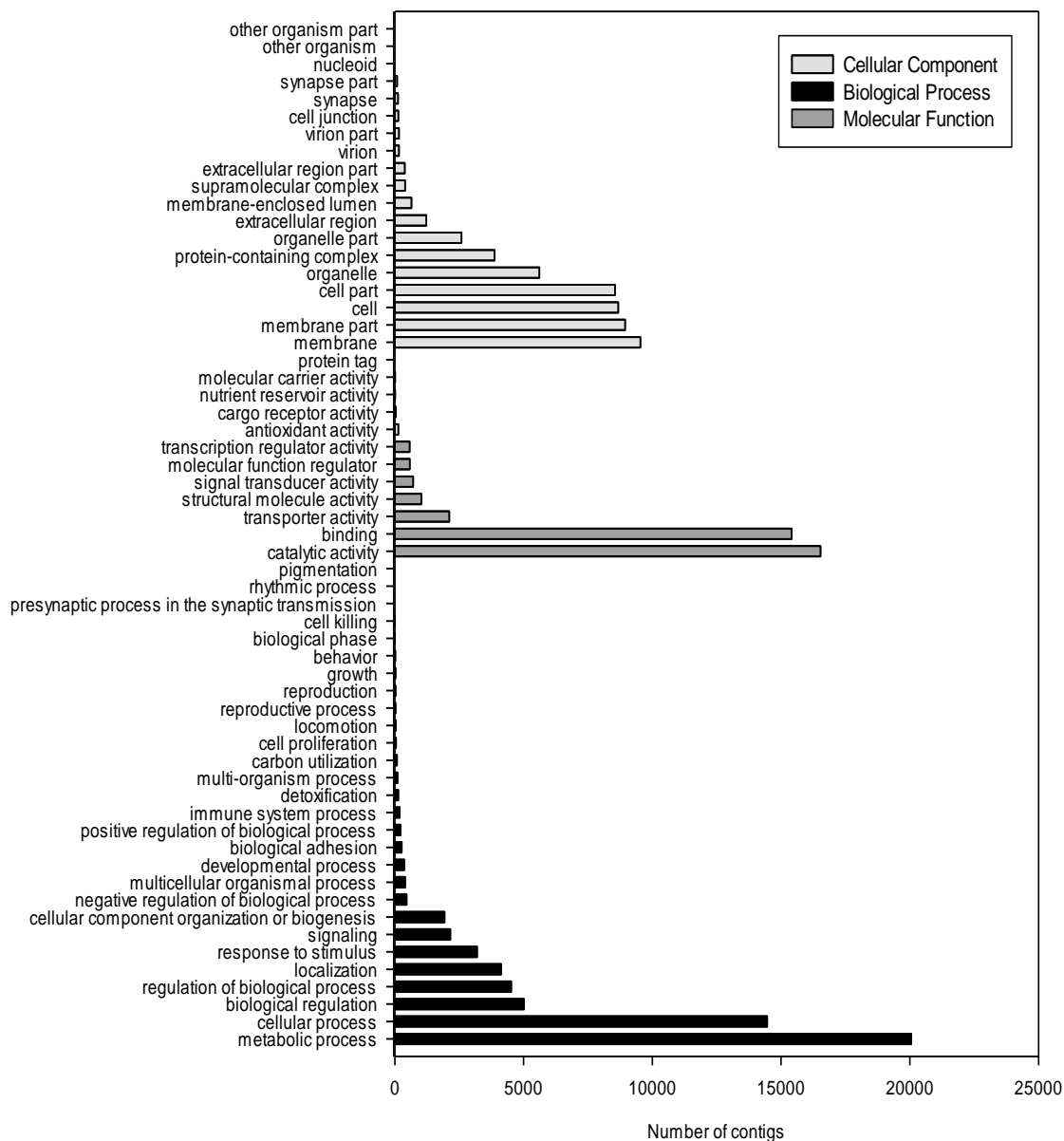


Figura 5. Classificação em termos de GO do transcrito de *H. armigera*. Os termos foram classificados nas seguintes categorias: Componente Celular, Função Molecular e Processo Biológico e estão representados quanto ao número de *contigs*.

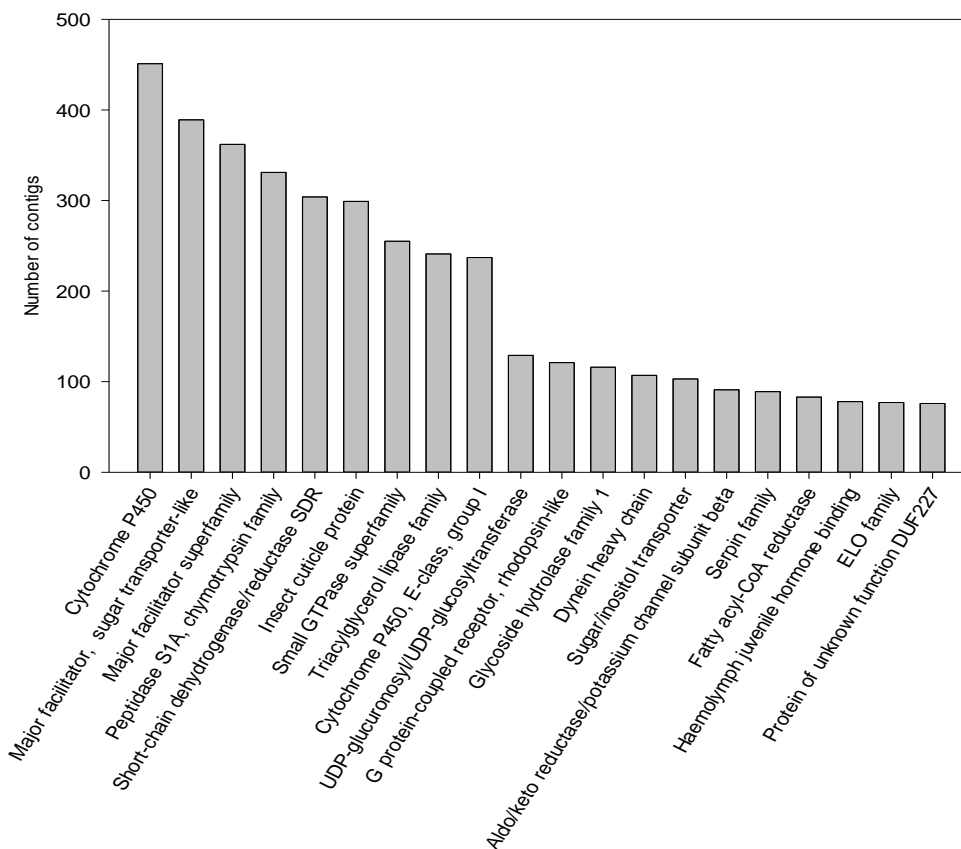


Figura 6. Famílias de proteínas mais abundantes no transcrito de *H. armigera*.

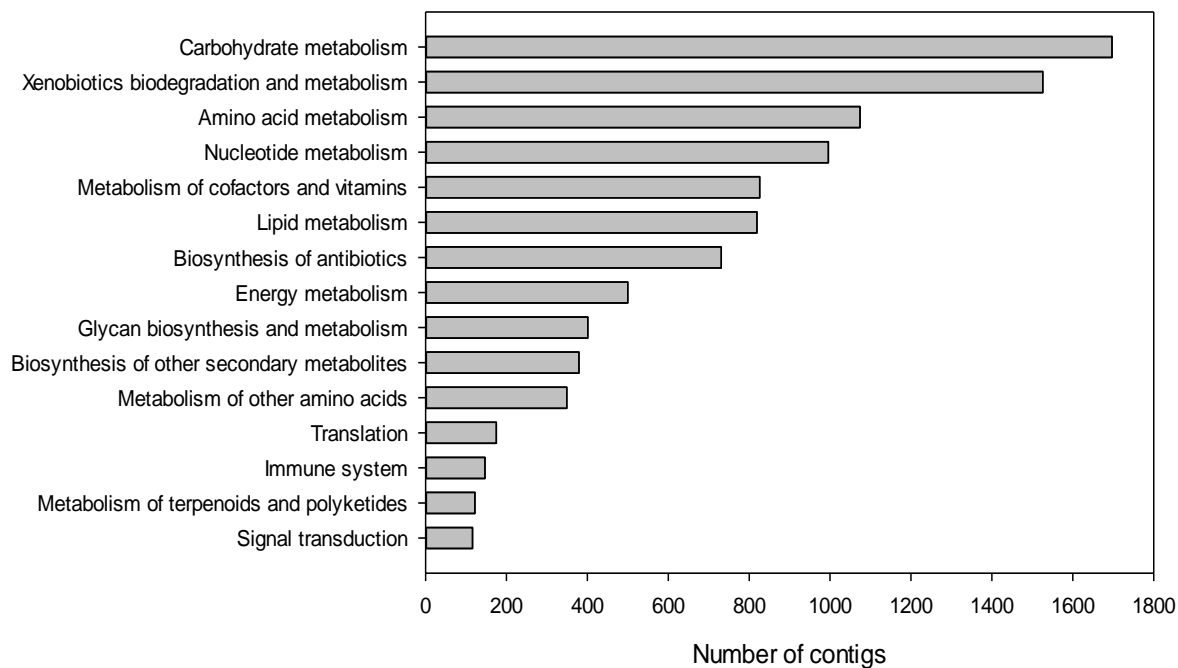


Figura 7. Abundância de genes codificantes de enzimas relacionadas às vias metabólicas de *H. armigera*.

4.6 Expressão Diferencial de Genes

Os *reads* não normalizados de todas as bibliotecas (excluindo as bibliotecas de referência) foram mapeados usando o pacote *RSEM* do *Trinity*, sendo obtida uma porcentagem de mapeamento médio de 53,1% e 65,4% para os *reads* das bibliotecas de algodão e tabaco, respectivamente. A expressão diferencial *in silico* entre as bibliotecas foi detectada pela triagem dos *contigs*/genes com variação estatística significativa maior que duas vezes. No total foram identificados 1295 genes diferencialmente expressos (3,10%) quando são comparadas as condições de alimentação em algodão e tabaco.

O coeficiente de determinação (R^2) entre as réplicas de cada tratamento foi calculado utilizando valores de *FPKM* transformados em escala logarítmica com base 2. Os valores observados de R^2 para os valores de $\text{Log}_2(\text{FPKM})$ são aceitos se estiverem acima do limiar aceitável para a análise estatística pelo *software EdgeR* ($R^2 \geq 0.75$). Uma análise de expressão significativa depende em grande medida da qualidade das réplicas biológicas, as quais devem apresentar a menor variabilidade possível. Na figura 8 pode se observar o *Heat-map* representando a distribuição dos valores de $\text{Log}_2(\text{FPKM})$ para os transcritos diferencialmente expressos “clusterizados” em agrupamentos com base nos valores de *fold change*.

O *Heat-map* demonstra que os transcritos diferencialmente expressos foram agrupados em dois *subclusters* diferentes. O *subcluster 1* (superior) agrupa 743 genes cuja expressão foi superior em insetos que se alimentaram com folhas de tabaco em relação àqueles alimentados com folhas de algodão. Em contrapartida, O *subcluster 2* (inferior) agrupa 552 genes cuja expressão foi superior em insetos que se alimentaram com folhas de algodão quando comparados àqueles alimentados com folhas de tabaco.

Para a análise de expressão diferencial, todos os 23.022 unigenes foram utilizados. No transcrito de Pierce et al., 2017, apenas 13.099 transcritos foram utilizados na análise de expressão diferencial. A regulação transcricional observada por Pearce et al. (2017) foi significativamente diferente de nossos resultados, considerando apenas a comparação entre algodão e tabaco.

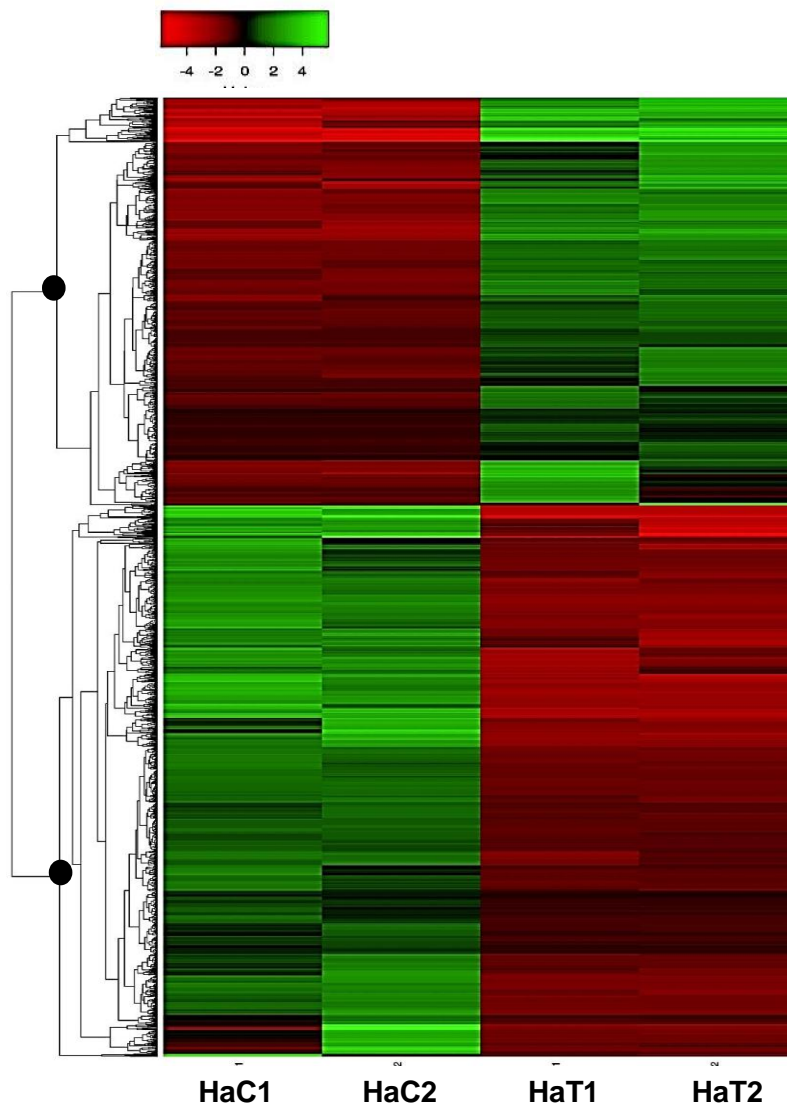


Figura 8. *Heat-map* representando os níveis de expressão normalizados dos genes diferencialmente expressos nas bibliotecas de algodão e tabaco. Os *contigs* foram agrupados em dois *subclusters* diferentes. A escala mostrando os valores de Log₂ (FPKM) representa os níveis de expressão desde o menor (-4) até o maior (4). HaC1 e HaC2 representam as bibliotecas de lagartas alimentadas por folhas de algodão; HaT1 e HaT2 representam as bibliotecas de lagartas alimentadas por folhas de tabaco.

De forma semelhante foram gerados dois gráficos com a distribuição dos grupos principais de genes diferencialmente expressos seguindo o método padrão de agrupamento do *EdgeR* (Figura 9).

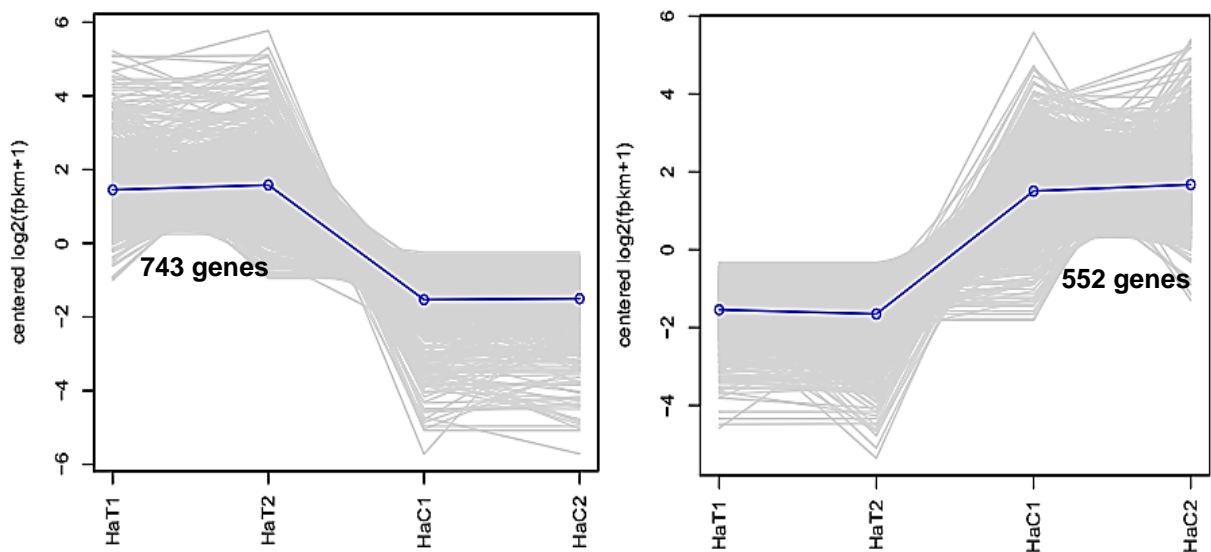


Figura 9. Agrupamentos de genes expressos diferencialmente gerados pelo *EdgeR*, em função dos valores de $\text{Log}_2(\text{FPKM})$. Um total de 743 genes foram superexpressos nos insetos alimentados com folhas de tabaco em detrimento dos 552 genes ativados em condições de alimentação com folhas de algodão.

4.7 Análise de enriquecimento por ontologia gênica

O enriquecimento de termos GO foi realizado com base no dado estatístico *FDR* (*false discovery rate*) do *software FUNC* e permitiu categorizar os genes diferencialmente expressos em dois conjuntos de expressão (genes super-expressos e genes subexpressos), ambos na condição do inseto alimentado com folhas de algodão, em referência aos alimentados por folhas de tabaco. Em seguida, cada grupo foi associado de forma independente com um grupo de termos GO estatisticamente enriquecido. Na figura 10 está representada a quantidade de termos GO associada a cada conjunto de genes, bem como o total de termos GO obtido após a filtragem usando a ferramenta *REVIGO*, com a qual foram eliminados termos GO redundantes.

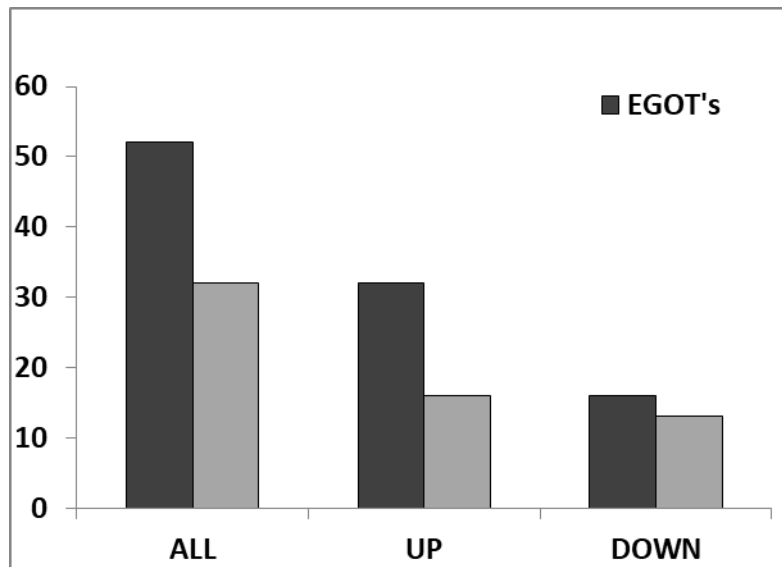


Figura 10. Quantidade total de termos enriquecidos de GO (*EGOT's*) associada aos genes diferencialmente expressos encontrados no transcrito de *H. armigera*. A figura representa o número de termos inicial obtido mediante a análise de enriquecimento do software *FUNC*, bem como a quantidade de termos resultantes da filtragem mediante análise com a ferramenta *REVIGO*. Os dois agrupamentos de genes (super-expressos e sub-expressos) estão determinados para os insetos alimentados com algodão em relação aos insetos alimentados com tabaco.

Após a análise do *REVIGO* foram selecionados os termos GO mais enriquecidos em cada conjunto de genes diferencialmente expressos (figura 11). O grau de enriquecimento foi definido pela proporção entre a frequência observada do termo no conjunto de genes diferencialmente expressos e a frequência esperada do termo, proveniente da anotação global do transcrito. Dentre os termos enriquecidos, àqueles que apresentaram maior quantidade de genes diferencialmente expressos estão envolvidos com atividade catalítica, atividade de hidrolase e proteólise para os genes superexpressos em lagartas alimentadas por folhas de algodão. Os genes que foram subexpressos em algodão apresentaram maior abundância nos termos de estrutura celular, constituintes da cutícula e metabolismo de carboidratos. Estas categorias de termos foram utilizadas para a escolha de genes para a validação por qPCR, com base no valor de *fold change*.

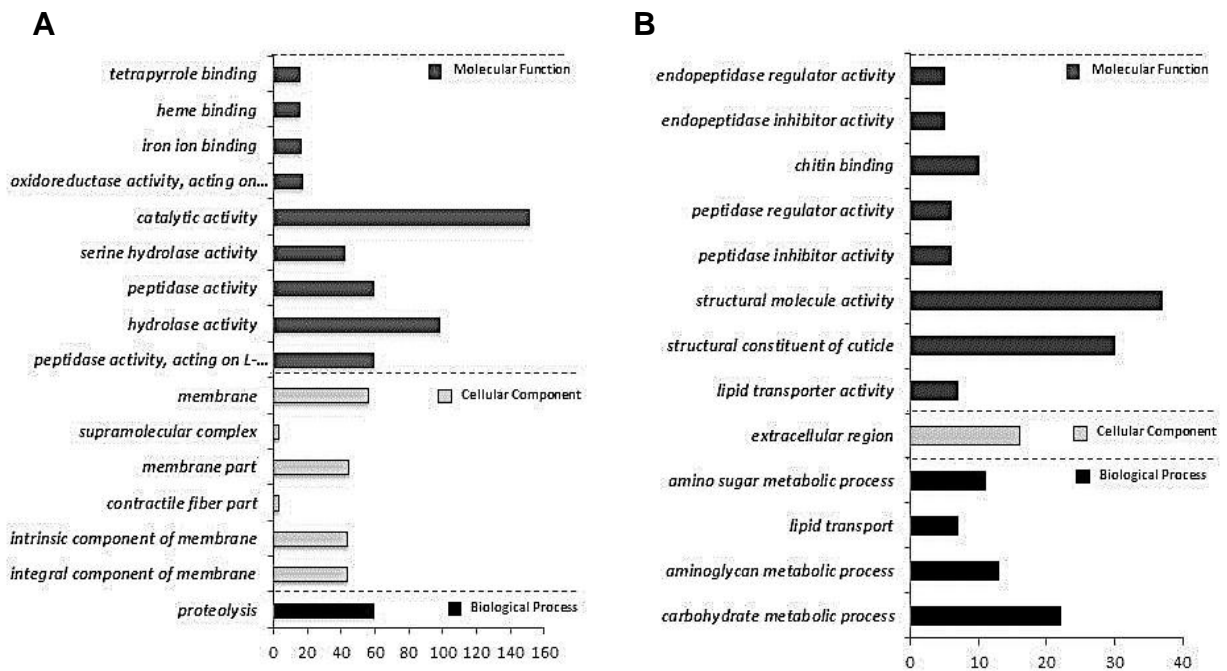


Figura 11. Termos GO mais enriquecidos para cada conjunto de genes diferencialmente expressos no transcrito de *H. armigera*. Em A, estão representados os termos não redundantes, com maior frequência observada para os grupos de genes superexpressos em insetos alimentados com algodão, obtidos a partir da análise do *FUNC*. Em B, os termos relacionados aos genes subexpressos para a condição alimentação com algodão. A figura mostra os termos das três categorias principais de ontologia gênica: processos biológicos, função molecular e componente celular.

4.8 Normalização de genes para qPCR e validação de genes do transcrito

Experimentos de análise de expressão gênica necessitam da inclusão de genes que funcionem como controles endógenos para corrigir variações na eficiência de amplificação das reações e na quantificação da expressão quando comparamos diferentes amostras. Esses genes são escolhidos devido a sua expressão constitutiva sob diferentes condições experimentais (BUSTIN, 2002; RADONIC et al., 2004; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Com o objetivo de padronizar as condições de expressão gênica em insetos alimentados com algodão e tabaco e validar os genes referências para essas condições foram escolhidos 8 genes de referência com base

em outros estudos já realizados com o inseto (CHANDRA et al., 2014). Os genes utilizados foram o fator de alongação 1 alfa (EF-1 α), subunidade ribossomal 18 (RPS18), subunidade ribossomal 13 (RPS13), succinato desidrogenase (SDH), β -actina, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), ubiquitina C (UBCE) e β -tubulina. Inicialmente, a expressão dos genes de referência foi avaliada utilizando a ferramenta online *RefFinder*. O *RefFinder* foi empregado para permitir um *ranking* abrangente da estabilidade da expressão dos oito genes referência, com base na integração de quatro algoritmos amplamente utilizados como *Bestkeeper*, *NormFinder*, *Genorm* e o método Delta Ct (tabela 5). De acordo com essa análise global, os dois melhores genes, SDH e GAPDH, foram selecionados para a validação dos genes expressos diferencialmente nas condições de alimentação avaliadas.

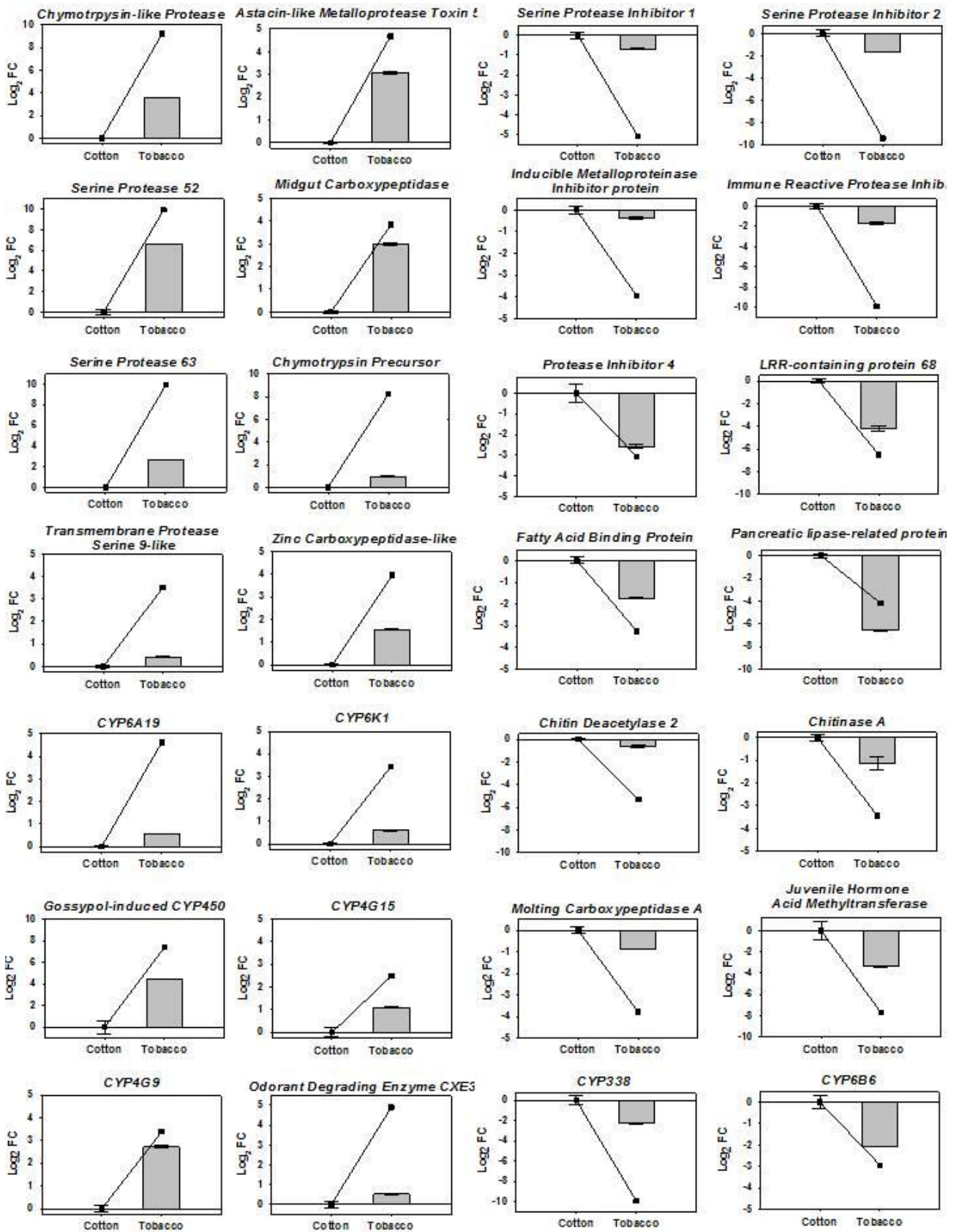
Tabela 5 - Lista dos melhores genes de referência de acordo com *RefFinder*.

Método	Ranking							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Delta CT	SDH	GAPDH	B-Tub	RPS18	EF1a	UBCE	RPS13	B-Actin
BestKeeper	UBCE	SDH	RPS18	GAPDH	RPS13	B-Tub	EF1a	B-Actin
Normfinder	SDH	EF1a	B-Tub	GAPDH	RPS13	RPS18	UBCE	B-Actin
Genorm	GAPDH RPS18		UBCE	SDH	EF1a	B-Tub	RPS13	B-Actin
Ordem recomendada	SDH	GAPDH	RPS18	UBCE	B-Tub	EF1a	RPS13	B-Actin

De acordo com os dados gerados, a partir do *EdgeR*, foram identificados os valores de *fold change* referentes à expressão diferencial de genes nos termos GO enriquecidos para os agrupamentos de genes super expressos e subexpressos em insetos alimentados com folhas de algodão em relação à expressão naqueles alimentados com tabaco. Este parâmetro (maiores valores de *fold change*) foi utilizado para a escolha dos genes que foram validados por RT-qPCR.

A figura 12 demonstra o perfil de expressão gênica por RT-qPCR dos genes escolhidos para a validação do transcrito em concordância com os valores de *fold change* resultantes da análise de expressão gênica diferencial após sequenciamento de RNA para as condições de alimentação avaliadas.

A fim de validar as bibliotecas gênicas geradas foram avaliados, por RT-qPCR, os níveis de expressão de 28 genes envolvidos principalmente na digestão e metabolismo dos xenobióticos. A figura 12 mostra a mesma tendência de expressão para muitos genes testados quando comparada a expressão obtida na análise de RNA-seq. No entanto, alguns genes foram expressos mais proeminentemente na análise RNA-seq do que na análise RT-qPCR.



Genes Superexpressos – Dieta Tabaco

Genes Subexpressos – Dieta Tabaco

Figura 12. Validação de 28 genes envolvidos nas vias de nutrição e desintoxicação de insetos em resposta a diferentes dietas (folhas de algodão ou tabaco). As linhas indicam os valores de DEGs na análise de RNA-seq e as barras indicam a análise de RT-qPCR. Ambos os valores foram transformados em Log2 de alteração de dobra (Log2FC).

Proteases serínicas, metálicas e enzimas de desintoxicação da família *CYP450* foram mais expressas em insetos alimentados com tabaco do que em insetos alimentados com algodão. Por outro lado, em insetos alimentados com tabaco houve redução na expressão gênica de genes inibidores de protease, metabolismo de quitina e enzimas de desintoxicação diferente daquelas superexpressas no grupo de insetos alimentados com tabaco.

As diferenças na expressão desses genes denotam o comportamento do inseto frente aos dois tipos de dieta, sendo que os principais genes envolvidos com a alimentação em tabaco são genes da família do citocromo P450, envolvidas com a detoxificação de metabólitos secundários e proteases serínicas e metálicas envolvidas na digestão de proteínas.

5. DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento de *H. armigera* nas duas dietas

Considerando a interação planta praga, insetos herbívoros generalistas tomam decisões mais lentas e menos precisas do que os especialistas ao selecionar hospedeiros, uma vez que devem discriminar e decidir entre estímulos sensitivos e nutricionais de uma variedade maior de possibilidades de alimentação (BERNAYS, 2000; RAGLAND et al., 2015. WHANG et al., 2017). Desta forma, insetos polípagos desenvolveram mecanismos de adaptação que exibem um grau considerável de plasticidade no comportamento de seleção e troca de plantas hospedeiras (BERNAYS, 2000; PETIT, 2015).

A *H. armigera* é um inseto polífago que se alimenta de muitas famílias de plantas hospedeiras e exibe grande capacidade de desenvolver resistência aos

inseticidas e contornar efetivamente a maioria das estratégias de manejo de pragas (SRINIVAS et al., 2004). Desta forma, esta espécie tem sido avaliada como um bom modelo generalista de herbivoria em insetos, sendo umas das espécies de pragas mais prejudiciais do mundo devido ao rápido desenvolvimento de resistência frente aos inseticidas (CHO et al., 2008; VOGEL et al., 2014).

Neste trabalho, o desempenho de crescimento e as respostas transcricionais de *Helicoverpa armigera* frente às duas diferentes dietas foram elucidados. Em insetos generalistas, esses dados constituem-se de componentes importantes que justificam os mecanismos de sobrevivência e adaptação fisiológica em novas plantas hospedeiras (RAGLAND et al., 2015).

Em relação ao tempo de desenvolvimento em cada dieta, houve diferença significativa entre os insetos alimentados com folhas de algodão e de tabaco. As lagartas têm o sítio de alimentação preferencial em partes reprodutivas da planta de algodão (LIU et al. 2004), causando perdas econômicas na produção mundial desta cultura e, mais recentemente na produção algodoeira do Brasil (CZEPAK et al., 2013; SPECHT et al., 2013). Neste estudo, apesar de as folhas não serem os tecidos de algodão preferenciais para a alimentação da lagarta, o inseto se desenvolveu mais rapidamente neste tecido quando comparado ao mesmo tempo de desenvolvimento em tabaco.

Lagartas de 1^o e 2^o ínstaes adaptam-se facilmente à alimentação em folhas de algodão e apresentam as menores taxas de mortalidade nesta fase do desenvolvimento, quando comparadas com outras plantas hospedeiras. Apesar disso, semelhante aos dados observados neste estudo, entre o 4^o e 6^o ínstaes ocorre um decréscimo da taxa de sobrevivência das lagartas alimentadas neste hospedeiro, mesmo quando alimentadas nos botões florais, sítios preferenciais de alimentação em algodão (LIU et al. 2004; CUNNINGHAN, 2014).

Bhonwong et al., (2009) e Safuraie-parizi et al.,(2014) também relataram a mortalidade das lagartas em diferentes ínstaes, em condições de laboratório, frente às condições de alimentação em plantas de tomate, que faz parte da dieta generalista do inseto. Além disso, foi observada alta mortalidade em lagartas

neonatas devido à ação dos tricomas foliares de tomate, de forma semelhante à alta taxa de mortalidade, observada neste estudo, nas lagartas de 1º instar alimentadas com tabaco, cujas folhas são ricas em tricomas foliares.

Bally et al., (2016) também demonstraram que a alimentação de lagartas neonatas de *H. armigera* em amostras de tecido foliar de *N. benthamiana* em diferentes idades afeta o desenvolvimento e o ganho de peso do inseto. Após 4 dias de alimentação nos tecidos foliares de 1, 2, 3 ou 5 semanas, cerca de 90% das larvas ainda havia sobrevivido. No entanto, o consumo de folhas foi mínimo em plantas com 7 semanas, quando a taxa de crescimento larval foi prejudicada e a taxa de sobrevivência caiu para cerca de 50% em plantas com essa idade.

De forma diferente, foi observado neste estudo que houve 100% de mortalidade em lagartas neonatas alimentadas em folhas de *N. benthamiana* de plantas com idades entre 4 e 5 semanas. Além disso, apesar de o bioensaio de alimentação ter sido iniciado com insetos no 2º estágio, houve aproximadamente 50% de mortalidade observada no 3º estágio, confirmando os efeitos deletérios da alimentação provocados pelos mecanismos de defesa da planta, ainda no início do desenvolvimento do inseto.

De modo geral, a grande maioria das plantas sintetiza metabólitos secundários como compostos de defesa cuja expressão representa o mecanismo de coevolução entre os insetos fitófagos e suas plantas hospedeiras (JIN et al., 2019). Desta forma, tem sido bem discutido que para vários insetos herbívoros que experimentam na dieta um composto específico (ZHOU et al., 2009; ZHOU et al., 2010) ou partes da planta, tendem a aumentar a relativa aceitabilidade desse composto favorecendo ou não a adaptação a uma nova planta hospedeira (THOMING et al., 2013; PETIT et al., 2015).

Os metabólitos com atividade inseticida podem ser exemplificados pelos terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos (BOULOGNE et al., 2012). Plantas de tabaco defendem-se dos insetos predadores induzindo a síntese do alcaloide nicotina, assim como plantas de algodão aumentam a síntese do composto fenólico gossipol. A toxicidade do gossipol pode ser principalmente atribuída aos grupos

aldeídos altamente reativos que interagem com os aminoácidos das proteínas do inseto, bem como devido à presença de seis grupos hidroxil fenólicos (DODOU, 2005).

O conhecimento sobre os mecanismos específicos de detoxificação do gossipol em lagartas de lepidópteros ainda é limitado (JIN et al., 2019). KREMPL et al., (2016) demonstraram que, após a ingestão, uma proporção do gossipol é metabolizado por glicosilação e subseqüentemente excretado nas fezes por *H. armigera* e *H. virescens*, apresentando uma reatividade reduzida e uma excreção aumentada.

Quando administrado na dieta, o aumento de doses sucessivas de gossipol influencia na perda de peso das lagartas de *H. armigera* e estimula a expressão de diversos genes de detoxificação da família P450 (CELORIO-MANCERA et al., 2011; VOGEL et al., 2014). Os padrões espaciais e temporais dessa expressão gênica podem tanto ser dependentes da concentração do gossipol, quanto diferir entre os tecidos alvos e são muito semelhantes à resposta a alguns inseticidas (TAO et al., 2012; VOGEL et al., 2014).

Plantas de *Nicotiana benthamiana* tem sido amplamente utilizadas como plantas modelo devido ao rápido ciclo de vida e facilidades de transformação genética para uso em aplicações biotecnológicas em engenharia metabólica, produção de vacinas, interação planta microrganismo e silenciamento gênico (BALLY, et al., 2018), bem como em estudos da interação planta praga (ZHANG et al., 2016; BALLY, et al., 2016). Neste estudo, os resultados do bioensaio de alimentação sugerem que a maior parte das lagartas de *H. armigera* não consegue completar o seu ciclo de vida em *N. benthamiana* sendo suscetíveis aos efeitos deletérios da alimentação nestas plantas.

Dentre os mecanismos que impedem a herbivoria em plantas de *Nicotiana*, a expressão do alcaloide nicotina tem sido relatada na defesa contra insetos, pois exerce efeitos neurotóxicos letais reduzindo, efetivamente, a taxa de ingestão dos tecidos vegetais (TODD et al., 2010). As plantas de *Nicotiana spp.* também produzem inibidores de tripsina, que impedem os insetos de digerirem as proteínas

da dieta. O efeito combinado da expressão de nicotina e inibidores de protease inibe o crescimento das lagartas mais do que a ação isolada destes elementos de defesa atuando sozinhos (STEPPUHN & BALDWIN, 2007; GOG et al. 2014).

Insetos generalistas como *H. armigera* devem consumir grandes quantidades de material vegetal para atender às suas necessidades nutricionais e, ao mesmo tempo, lidar com as numerosas defesas mecânicas e químicas impostas pelas plantas hospedeiras (RAGLAND, 2015, WANG et al., 2017). Neste trabalho foi observado que houve alta taxa de mortalidade das lagartas alimentadas com folhas de *N. benthamiana* provavelmente devido à ativação dos metabólitos de defesa da planta. As respostas transcricionais frente à alimentação nos insetos sobreviventes destacaram, principalmente, a superexpressão de genes envolvidos com a detoxificação e digestão.

5.2 Respostas transcricionais relacionadas às dietas

As análises de RNA-Seq de insetos alimentados com diferentes dietas revelaram perfis distintos de expressão gênica. As diferenças observadas na mortalidade e redução na taxa de crescimento são acompanhadas pela regulação de fatores associados à digestão e metabolismo, desintoxicação, crescimento e imunidade, entre outros (VOGEL et al., 2014). Tais diferenças na expressão entre genes relacionados às funções fisiológicas fornecem dados sobre os mecanismos de resistência do hospedeiro em *H. armigera*.

Quando os insetos se alimentam de uma planta geralmente ocorre o acúmulo de diferentes metabólitos para evitar o agressor, o que ocasiona uma contra-defesa do inseto. Essa interação envolve mecanismos fisiológicos, bioquímicos e genéticos complexos, como a ativação de enzimas de desintoxicação (MAO et al., 2007; CHEN et al., 2019). A análise transcricional comparando a resposta de insetos polípagos que se alimentam de plantas diferentes fornece informações sobre esses processos.

No presente estudo, foi avaliado se o inseto generalista *H. armigera* pode se desenvolver em duas espécies de plantas, algodão e tabaco, comparando dados transcritômicos gerados pela alimentação de tabaco e algodão. Os dados mostraram 5.936 genes a mais quando comparados aos 17.086 genes codificadores de proteínas previstos pelo genoma disponível de *H. armigera* (PIERCE et al., 2017). Números mais altos de unigenes (> 50.000) foram relatados em outros transcritomas específicos de tecidos de *H. armigera* (ZHANG et al., 2015; YUAN et al., 2018), embora essa variabilidade seja fortemente afetada pelas condições de sequenciamento.

A regulação transcricional observada por Pierce et al., 2017 foi significativamente diferente daquela observada neste estudo, considerando apenas a comparação entre algodão e tabaco. Embora a maioria dos termos GO regulados positivamente em lagartas alimentadas com algodão estejam relacionados aos processos proteolíticos no estudo anterior, os mesmos foram enriquecidos e regulados positivamente neste estudo. Além disso, Pearce et al., 2017 demonstraram que famílias relacionadas à detoxificação como P450 e CCEs eram as categorias reguladas mais representativas nas lagartas alimentadas com tabaco.

Da mesma forma, neste trabalho o termo de GO associado à família do citocromo P450 foi enriquecido nos genes super expressos de insetos alimentados com tabaco, embora alguns genes P450 tenham sido super expressos também no grupo alimentado com algodão. Isto se deve, provavelmente, ao fato de os genes P450 estarem envolvidos na detoxificação do gossipol, que faz parte do sistema de defesa do algodão contra patógenos e insetos herbívoros, sendo tóxico para muitos organismos, pois está envolvido no estresse oxidativo, danificando o DNA na presença de íons metálicos (KREMPL et al., 2016).

Os termos de GO relacionados ao metabolismo de carboidratos, inibidores de proteases (IP) e transportadores lipídicos foram enriquecidos em genes de insetos alimentados com algodão. Recentemente, foi proposto que um mecanismo de regulação das proteases em *H. armigera* leva a uma estratégia de adaptação para lidar com os componentes antinutricionais das plantas. Isso se baseia na coexpressão de IPs endógenos em lagartas alimentadas com hospedeiros incomuns

(LOMATE et al., 2018). Uma ampla gama de funções metabólicas foi observada no conjunto de genes super expressos em algodão, condição em que *H. armigera* mostrou uma adaptação mais eficiente. Conforme descrito por Pierce et al., 2017, também foi observado que o algodão é um hospedeiro mais adequado para o inseto.

Em espécies polípagas como *H. armigera* é comum que o repertório de enzimas digestivas e proteínas transportadoras demonstrem uma expressão mais alta nos hospedeiros mais adequados (CALLA et al., 2017; VOGEL et al., 2018). Diferentes estudos descreveram como os mecanismos de desintoxicação diferem entre espécies generalistas e especializadas e o impacto disso na seleção de hospedeiros (ROY et al., 2016; CRAVA et al., 2016; MALKA et al., 2018). No entanto, menos atenção é dada às moléculas que capturam diretamente os nutrientes do hospedeiro e como seus perfis de expressão afetam a adaptação a um determinado hospedeiro.

É válido destacar que é possível que um inseto generalista exiba um repertório de defesa semelhante em resposta aos diferentes hospedeiros que produzem compostos tóxicos, como foi observado em neste estudo, com a maioria das principais famílias de desintoxicação representadas tanto em algodão quanto em tabaco. Desta forma, a principal diferença observada entre as dietas refere-se à maior expressão de genes envolvidos com a nutrição do inseto em algodão.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O transcrito de *Helicoverpa armigera* gerado neste trabalho representa o perfil de genes expressos em diferentes condições de alimentação em folhas de tabaco e algodão. Os dados apresentados demonstraram que 3% dos genes componentes do transcrito foram diferencialmente expressos para as condições de alimentação, o que representou um total de 1295 genes de uma quantidade de 53.497 *contigs* montados.

Alguns genes diferencialmente expressos relacionados com os mecanismos de digestão, detoxificação de xenobióticos e componentes da membrana peritrófica do inseto foram validados. Novas análises detalhadas acerca de outros componentes destas vias são necessárias a fim de propor um modelo que justifique a diferença nos perfis de expressão para as condições estudadas. Além disso, com base nos termos GO enriquecidos foram identificados possíveis alvos para o controle do inseto por meio de ferramentas biotecnológicas como silenciamento gênico via RNA interferente.

Apesar de *H. armigera* ser um herbívoro polífago e de plantas de tabaco serem utilizadas como plantas modelos em estudos de interação planta-inseto, os resultados do bioensaio de alimentação sugerem que as lagartas não conseguem completar o seu ciclo de vida em *N. benthamiana* sendo suscetíveis aos mecanismos de defesa da planta, uma vez que o desempenho larval resultou em alta mortalidade, maior período de desenvolvimento e baixo peso pupal quando comparadas ao grupo alimentado em plantas de algodão. As informações obtidas neste trabalho são importantes para a discussão de estratégias de manejo de *H. armigera*, pois fornece uma melhor compreensão de sua capacidade de sobreviver em diferentes plantas hospedeiras.

**CAPÍTULO II – DESAFIOS E PERSPECTIVAS PARA O SILENCIAMENTO
GÊNICO EM *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: noctuidae)**

RESUMO

A *Helicoverpa armigera* é uma praga polífaga que vem trazendo prejuízos em diversas culturas no Brasil, principalmente em lavouras de soja, algodão e feijão. Esse contexto ressalta a importância do desenvolvimento de estratégias sustentáveis de controle, como a abordagem de silenciamento gênico via RNAi. Considerando a dificuldade de silenciamento de genes em lepidópteros relatada na literatura, principalmente se o dsRNA for administrado na hemolinfa do inseto, este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes estratégias para o silenciamento de genes deste inseto. Como gene alvo, foi utilizado um receptor de neuropeptídeo associado à integração metabólica, o receptor do hormônio adipocinético (AKHr). Foram analisadas as seguintes condições experimentais: vias de administração de dsRNA oral e tópica; *time course* de silenciamento em 24, 48 e 72 horas após a ingestão de dsRNA; administração do dsRNA em diferentes doses na sua forma não encapsulada e encapsulada. Inicialmente, foi avaliada a expressão relativa do gene alvo durante a fase larval de desenvolvimento demonstrando expressão maior em lagartas de quinto e sexto ínstar. O tempo de 72 h foi o período que resultou em maior eficiência no silenciamento e, por isso, foi o tempo utilizado para a coleta das lagartas em todos os experimentos. Em seguida, lagartas de quinto ínstar foram alimentadas com dieta artificial contendo dsRNA nas doses de 250 ng, 500 ng e 1 µg revelando que na dose de 1 µg houve a maior redução da expressão gênica (56%). Com a perspectiva de potencializar os efeitos do silenciamento, amostras de dsRNA para o gene AKHr foram encapsuladas com nanopartículas a fim de proteger a molécula da ação de possíveis nucleases intestinais. Entretanto, os resultados não demonstraram efeitos potencializadores no silenciamento gênico, possivelmente em virtude das propriedades químicas da partícula e do pH intestinal. Ademais, foi observado maior índice de redução da expressão gênica quando o dsRNA foi administrado através da alimentação em detrimento de sua aplicação por via tópica. Além disso, foi avaliada a influência dos efeitos do silenciamento no peso dos insetos utilizando dsRNA não encapsulado e não houve diferença significativa entre os grupos tratados com dsRNA e os controles.

Palavras-chave: *Helicoverpa armigera*, silenciamento gênico, controle de insetos.

1. INTRODUÇÃO

Os organismos eucariotos, incluindo insetos, possuem um mecanismo comum para o silenciamento específico de genes, seja pela clivagem do RNAm ou pela inibição da tradução desse RNAm, que é desencadeado pela presença de dsRNA. Esse processo é conhecido como RNA interferente (RNAi) em animais e silenciamento gênico pós-transcricional em plantas (HANNON, 2002; BAULCOMBE, 2004). Desde a descoberta inicial do mecanismo de RNAi em *Caenorhabditis elegans* por Fire et al (1998) vários estudos foram desenvolvidos e agora está claro que o silenciamento gênico mediado por RNAi é um mecanismo de regulação gênica conservado em muitos eucariotos (HANNON, 2002; CARTHEW; SONTHEIMER, 2009; GEBERT; MACRAE, 2019).

O potencial da tecnologia de RNAi como uma estratégia promissora na proteção de culturas contra insetos-praga vem sendo estudado nos últimos anos (BAUM et al., 2007; PRICE; GATEHOUSE, 2008; HUVENNE; SMAGGHE, 2010; XUE et al., 2012; NARVA et al., 2013; CHRISTIAENS et al., 2016). O princípio do mecanismo de RNAi envolve a introdução de dsRNAs específicos para o silenciamento de genes alvo essenciais ao inseto-praga causando uma mortalidade rápida e generalizada desses insetos. Em resumo, a entrada de dsRNA na célula resulta no seu processamento por uma Ribonuclease III, chamada Dicer-2, em pequenos RNAs interferentes (siRNAs). Esses duplex de 21 a 24 nucleotídeos são subsequentemente incorporados ao complexo RISC e uma proteína Argonaute 2 degrada uma das fitas e a outra, chamada de fita guia, ligada ao RISC, permite o emparelhamento de bases Watson-Crick do complexo com o RNAm alvo complementar resultando no silenciamento gênico específico (AGRAWAL et al., 2003; PECOT et al., 2011). Nos últimos anos, pesquisas demonstraram que o controle de pragas baseado em RNAi é uma opção viável para várias espécies (BAUM et al., 2007; ZHA et al., 2011; BOLOGNESI et al., 2012; COELHO et al., 2016; MACEDO et al., 2017).

A eficiência do mecanismo de RNAi é diretamente influenciada pelo método de entrega do dsRNA. Portanto, para ser usado como agente de controle de insetos

na agricultura é importante que o método de entrega seja corretamente selecionado (TERENIUS et al., 2011). Atualmente, os métodos mais indicados para esse fim são a ingestão e a penetração na cutícula do inseto (BAUM; ROBERTS, 2014). Estudos utilizando a alimentação do dsRNA revelaram efeitos eficazes na diminuição dos transcritos de determinado gene em muitos insetos, incluindo insetos das ordens, Coleóptera, Hemíptera e Lepidoptera (BAUM et al., 2007; TIAN et al., 2009; ZHA et al., 2011).

O método de entrega do dsRNA através da alimentação é comparativamente atraente porque é um meio mais natural de entrada do dsRNA no corpo do inseto, além de ser de fácil manipulação e menos invasivo ao inseto (CHEN et al., 2010). Entretanto, a administração oral enfrenta algumas barreiras, a exemplo a presença de nucleases no intestino de muitos insetos que resultam na degradação do dsRNA (CHRISTIAENS et al., 2018). Nesse contexto, a rápida degradação do dsRNA por ribonucleases extracelulares no intestino é um fator-chave na determinação da eficiência do RNAi em várias espécies diferentes de insetos (ZHANG et al., 2017; SONG et al., 2017; GARCIA et al., 2017). Portanto, nanopartículas podem ser utilizadas para reduzir a degradação do dsRNA por nucleases e aumentar a captação celular do dsRNA, a exemplo as nanopartículas de quitosana (ZHANG et al., 2010; JOGA et al., 2016). As nanopartículas são utilizados devido à sua estabilidade e facilidade de modificação da superfície (VAUTHIER et al., 2003; HERRERO-VANRELL et al., 2005).

As nanopartículas de quitosana são projetadas por auto cumulação de policátions com dsRNA por forças eletrostáticas entre cargas positivas e negativas dos grupos amino da quitosana e fosfato do ácido nucleico, respectivamente. Este método é adequado para dsRNA e siRNA longos. Além disso, os polímeros de quitosana são ambientalmente seguros e biodegradáveis (DASS; CHOONG, 2008). Em larvas de *Ostrinia furnacalis*, um lepidóptero, a alimentação através de dieta de dsRNA encapsulado com nanopartículas resultou em diminuição da abundância de transcritos do gene alvo que levou a efeitos como: tamanho larval reduzido, falha na muda e eventualmente morte (HE et al. 2013).

O uso de RNAi para a proteção de culturas também depende, além da resposta de RNAi por via oral no inseto alvo, da eficácia individual dos alvos escolhidos (KNORR et al., 2018). Isso ocorre porque a diminuição da transcrição via RNAi parece ser bastante rápida (LI et al., 2016). Assim, um fenótipo letal induzido por RNAi depende de fatores como os papéis desempenhados pelo gene alvo, a função do produto do gene alvo, rotatividade da proteína codificada pelo gene alvo, dentre outros fatores (KNORR et al., 2018).

Em insetos, o hormônio adipocinético (AKH) tem sido associado ao controle do metabolismo energético devido ao seu papel na estimulação da mobilização/liberação de lipídios, carboidratos e aminoácidos (ALVES-BEZERRA et al., 2016). Esse neuropeptídeo foi inicialmente identificado nas glândulas retrocerebrais (*corpora cardiaca*) de *Locusta migratoria* e caracterizado como um fator que estimula a mobilização lipídica para a atividade locomotora (voo) nesses insetos (STONE et al., 1976). A regulação do metabolismo energético pelo AKH durante a atividade locomotora disponibiliza metabólitos circulantes como diacilgliceróis (DAG), trealose ou prolina na hemolinfa pela ativação de enzimas como glicogênio fosforilase e triacilglicerol lipase que quebram o glicogênio e o triacilglicerol armazenados no corpo gordo (ALVES-BEZERRA et al., 2016).

Em alguns insetos como a mosca da carne, *Sarcophaga crassipalpis*, o AKH é liberado após uma refeição de proteína, o que é necessário para a atividade proteolítica do intestino médio (BIL et al., 2014). O AKH atua como um regulador geral da homeostase em insetos, influenciando processos que demandam energia, como produção de ovos, comportamento alimentar, crescimento larval, muda e resposta imune (LEE; PARK 2004; ISABEL et al., 2005; LORENZ; GÄDE, 2009; ARRESE; SOULAGES, 2010; ATTARDO et al., 2012; KONUMA et al., 2012). O AKH também desempenha um papel protetor em resposta a estresse oxidativo (HUANG et al., 2011; BEDNÁŘOVÁ et al., 2015). Dessa forma, esses neuropeptídeos são reconhecidos como envolvidos em uma ampla variedade de funções e, por isso, são classificados como neurormônios, neurotransmissores e neuromoduladores (GÄDE; MARCO, 2009).

A maioria dos neuropeptídeos de insetos, incluindo AKHs, após serem liberados na hemolinfa, exerce sua função através da ligação a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) localizados na membrana dos adipócitos dos corpos gordurosos, denominados receptores do AKH (AKHrs) (GÁLIKOVÁ et al., 2015). Após ligar e ativar um AKHr, várias cascatas de sinalização celular são ativadas (CAERS et al., 2012). Esses receptores são proteínas transmembranas compostas por sete alfa hélices e os primeiros AKHrs clonados foram os de *Drosophila melanogaster* e *Bombyx mori* (PARK et al., 2002; STAUBLI et al., 2002). Atualmente, os GPCRs são apontados como alvos para o controle de insetos-praga (AUDSLEY; DOWN, 2015; VERLINDEN et al., 2014). Nesse contexto, AKHr parece ser um alvo em potencial para o controle de *Helicoverpa armigera*, praga polífaga que vem trazendo prejuízos a diversas culturas no Brasil, utilizando silenciamento gênico mediado por RNAi. Além disso, o controle de pragas baseado em RNAi é considerado um método de controle ambientalmente seguro, dada a especificidade e a biodegradabilidade do dsRNA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver método eficiente para o silenciamento gênico via RNAi em *H. armigera* como alternativa para controle da praga.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar o receptor do hormônio adipocinético (AKHr) no transcrito de *Helicoverpa armigera*;
- Determinar o perfil de expressão do receptor do hormônio adipocinético (AKHr) na fase larval do ciclo de vida de *H. armigera*;
- Realizar experimentos de silenciamento do AKHr em lagartas de *H. armigera* através de administração de dsRNA via oral e aplicação tópica, na forma livre ou encapsulado;
- Avaliar os efeitos moleculares do silenciamento quantificando a expressão relativa de transcritos dos genes nos insetos tratados e não tratados com dsRNA, utilizando PCR em tempo real;
- Avaliar os efeitos do silenciamento ao longo do desenvolvimento de *H. armigera*.

3. METODOLOGIA

3.1 Identificação do gene receptor de AKH (AKHr) no transcrito de *Helicoverpa armigera*

O gene do receptor do hormônio adipocinético (AKHr) foi identificado no transcrito de *H. armigera* através de local-tBlastN. Para tanto, a busca no transcrito foi realizada utilizando como “isca” a sequência proteica do AKHr encontrado em *B. mori* (XP_012546718.1). A busca por ORF (Open Reading Frame – sequência de leitura aberta) foi realizada utilizando o ORF Finder (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orf_finder/).

3.2 Obtenção dos insetos, extração de RNA e síntese de cDNA

Os insetos foram obtidos, na fase de ovo, no laboratório de biotecnologia e semioquímicos de insetos da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os ovos permaneceram em dieta artificial até a eclosão. Após a eclosão dos ovos, as lagartas foram mantidas separadamente em pequenos potes contendo dieta artificial até o sexto ínstar de desenvolvimento biológico. Insetos foram coletados em todos os instares (primeiro ao sexto) da fase larval, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C para posterior extração de RNA total de cada instar separadamente. Durante todo o ciclo de desenvolvimento os insetos foram acondicionados em B.O.D. (do inglês - Biochemistry Oxygen Demand), a 28 °C e com fotoperíodo 16h/8h.

Para extração de RNA, as lagartas imersas em nitrogênio líquido foram pulverizadas em almofariz com auxílio de pistilo. O RNA total de todos os instares larval foi extraído utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi tratado com DNase I (Ambion, Life Technologies) por 20 minutos a 37 °C. Após o tratamento, a qualidade e a integridade do RNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% e a concentração de RNA total foi determinada utilizando o espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare). Após o tratamento com DNase I, 2 µg de RNA total foram

utilizados para síntese de cDNA com o kit *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen™) seguindo as recomendações do fabricante.

3.3 Análise da expressão de AKHr por RT-qPCR

A expressão do gene AKHr durante a fase larval de *H. armigera* (primeiro ao sexto instar) foi analisada por RT-qPCR. Para tanto, *primers* específicos para o gene e *primers* para genes normalizadores (beta-tubulina - β -TUB - e o fator de alongação 1 alfa – EF1 α) foram utilizado e estão listados na tabela 1. Cada reação para RT-qPCR foi feita com volume final de 10 μ L, sendo 5,0 μ L de GoTaq® qPCR Master Mix 2X (Promega), 2,6 μ L de água livre de nucleases (Promega), 0,2 μ L de cada primer (direto e reverso – ambos na concentração inicial de 10 μ M) e 2,0 μ L de cDNA diluído 20 vezes. A RT-qPCR foi realizada no termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems, EUA) usando o seguinte programa: 95 °C 20 s., seguido de 40 ciclos de 95 °C por 3 s e 60 °C por 30 s. Ao final dos 40 ciclos uma curva de dissociação para cada fragmento amplificado (60 - 95°C, a cada 0,5 °C por 1 s) foi feita para verificar a possível formação de dímeros de *primer* ou contaminação da amostra. As reações de RT-qPCR foram feitas em triplicata e controles negativos contendo água em vez de cDNA foram incluídos para verificar presença de contaminantes nas amostras. Os níveis de expressão foram determinados como o número de ciclos necessários para alcançar um limite fixo na fase exponencial da PCR. O número de ciclos, referido como valor de Ct (cycle threshold), foi utilizado para determinação da expressão relativa de cada gene em cada amostra mediante o método de Livak e Schmittgen (2001).

Tabela 1. Lista de primers utilizados para clonagem e RT-qPCR.

Gene alvo	Primer	Sequencias(5' – 3')	Objetivo
AKHr	AKHR FW AKH RV	TGTTGCCGATCTTATGGTGA AGCACGAAGCTGGAGAGGTA	RTq-PCR
AKHr	AKHR FW AKH RV	CCCAGCTGATGAAGAGGAAG CCGTAAGACACGCACTGGTA	Clonagem
AKHr	T7AKHR FW T7AKHR RV	TAATACGACTCACTATAGGGA GAGACCCAGCTGATGAAGA TAATACGACTCACTATAGGGA GAGACCGTAAGACACGCAC	PCR para síntese de dsRNA
GAPDH	GAPDH_Fw GAPDH_Rv	AGGTCATCCATGACAACCTTCG CACAGTTTACCAGAGGGTCCA	RTq-PCR
SDH	SDH_Fw SDH_Rv	TACAGACCCGTTATCGACCAG GCACCCGTGTTGAGAAAATTA	RT-qPCR

3.4 Desenho, Clonagem e síntese do dsRNA

A escolha do segmento do gene AKHr para a síntese da fita dupla de RNA específica foi feita utilizando o programa BLOCK-iT™ RNAi Designer (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>). Foi escolhida uma sequência com tamanho de 400 pb e primers específicos para o fragmento do gene selecionado foram sintetizados para posterior amplificação. Inicialmente, uma PCR convencional foi realizada utilizando cDNA das amostras de RNA total de lagartas do quinto instar de *H. armigera*. A PCR foi realizada com um passo inicial de 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos de incubação de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, seguidos de um passo de 72 °C por 5 minutos. Após a PCR as amostras foram analisadas em gel de agarose 1% e o fragmento gênico foi excisados do gel, purificado utilizando o QIAquick gel extraction Kit (QIAGEN, EUA) e submetido à clonagem utilizando o “TOPO® TA Cloning® Kit” (Invitrogen, EUA) com o vetor PCR®2.1 TOPO®. O vetor contendo o fragmento de interesse foi introduzido em células de *Escherichia coli* genótipo XL-1 Blue e os recombinantes foram selecionados para extração e purificação de plasmídeo utilizando o “QIAprep Spin Miniprep kit” (QIAGEN, EUA) conforme instruções do fabricante. Os plasmídeos

clonados foram verificados por digestão utilizando a enzima de restrição EcoRI, conforme o mapa de restrição do vetor pCR2.1 liberando o fragmento clonado. O DNA obtido a partir da extração plasmidial foi diluído na razão de 1:20 e utilizado para realização de PCR com primers específicos adicionado da sequência do promotor da enzima T7 RNA polimerase na extremidade 5' com as mesmas condições descritas anteriormente (Tabela 1). O produto dessa PCR (1 µg) foi utilizado para a síntese de dsRNA in vitro, conforme protocolo do kit MEGAscript® T7 High Yield (Ambion). A reação foi incubada por 16 h a 37°C, seguida por tratamento com DNase I por 15 minutos. Para anelamento do RNA fita dupla, os produtos da reação foram incubados a 70°C por 5 minutos e resfriados em temperatura ambiente. A purificação dos produtos da transcrição foi realizada com fenol/clorofórmio e subsequente precipitação com álcool isopropílico, conforme descrito no protocolo do kit. O dsRNA foi dissolvido em água tratada com DEPC e a quantificação foi obtida por espectrofotometria. A integridade do dsRNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.5 Síntese das nanopartículas: o complexo quitosana/dsRNA/surfactante

O dsRNA para o gene do AKHR de *H. armigera* foi encapsulado com partículas de quitosana com o objetivo de proteger o dsRNA da ação de possíveis nucleases intestinais do inseto e garantir a eficiência de entrega do dsRNA. A quitosana (95% desacetilada) utilizada no trabalho foi adquirida da empresa Polymar. O processo de encapsulamento do dsRNA foi realizado de acordo com as condições previamente determinadas no trabalho de Garcia (2019) com algumas modificações. Inicialmente foi feita uma solução de quitosana na concentração de 2 µg/µL dissolvida em ácido acético 0.1 M. O pH da solução foi ajustado para 8.0 e, posteriormente, a solução foi filtrada em filtro 0,22 µm (FilterPro). Para o encapsulamento foi utilizado 500 ng de quitosana para cada 300 ng de dsRNA em tampão triplo pH 8.0. Essa foi a razão ótima para a formação de nanopartículas determinada no trabalho de Garcia (2019). À solução de quitosana-dsRNA foi adicionado surfactante SURFOM 5204 CS (Oxiten) na concentração final de

0,01%. A adição de surfactante teve como objetivo melhorar a entrega do dsRNA, uma vez que o surfactante possui a capacidade de se incorporar a compostos hidrofóbicos (CHIAPPISI; GRADZIELSKI, 2015), como a parte externa da membrana célula criando uma bicamada em volta da superfície da nanopartícula (PAL; PAL, 2017).

3.6 Bioensaios de silenciamento do gene AKHr

Para os experimentos de silenciamento foram utilizadas lagartas de *H. armigera* no quinto e sexto ínstar. Nesses estágios as lagartas foram submetidas a jejum por 24 horas e mantidas, isoladamente, em bandejas entomológicas a fim de evitar o canibalismo típico da espécie. Após 24 horas de jejum as lagartas foram submetidas a diferentes concentrações e formas de entrega do dsRNA específico para AKHr. Foram testadas duas vias de entrega do dsRNA, a via oral e a via tópica. Além disso, o dsRNA, seja por via oral ou tópica, foi testado na forma encapsulado (nanopartículas de quitosana) e não encapsulado. Como dsRNA controle foi utilizado dsRNA para o gene correspondente à *green fluorescent protein* (GFP) ou para o gene da β -glucuronidase (GUS). Como controle do veículo foi utilizado água e/ou solução de quitosana. A entrega oral do dsRNA foi feita através de alimentação das lagartas com pequenos blocos de dieta (cubos de 2 mm³) contendo dose específica de dsRNA (250 ng, 500 ng, 1000 ng, 2000 ng e 4000 ng). Após alimentação as lagartas foram mantidas em dieta livre de dsRNA e monitoradas diariamente para verificar possíveis efeitos do silenciamento. Na via tópica gotículas (10 μ L) de dsRNA foram aplicadas em lagartas de quinto e sexto instar, na região dorsal com auxílio de pipeta graduada. Os insetos durante todos os experimentos foram acondicionados em B.O.D. (*Biochemistry Oxygen Demand*), a 28°C e com foto período 16/8h. Em todos os experimentos lagartas foram coletadas 24, 48 e 72 horas para extração de RNA total e verificação da eficiência do silenciamento por RT-qPCR (ver tópico 3.2 e 3.3 para os parâmetros utilizados na extração de RNA total, síntese de cDNA e RT-qPCR). Experimentos utilizando a entrega oral e dsRNA não encapsulado também foram realizados para avaliar o efeito do silenciamento do

gene AKHr no peso das lagartas e pupas de *H. armigera*. Após entrarem em fase de pupa os insetos foram monitorados a cada dois ou três dias. Para todos os experimentos foram utilizadas 10 lagartas em cada grupo experimental. Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da expressão do gene do AKHr

A fase larval é o estágio no qual o inseto mais se alimenta e conseqüentemente causa maiores prejuízos à agricultura (CZEPAK et al., 2013a). Dessa forma, essa foi a fase escolhida para os experimentos de silenciamento. Inicialmente, para definir em qual ínstar da fase larval havia a maior expressão do gene do AKHr e, assim, definir o ínstar adequado ao silenciamento deste gene foi realizada a análise do perfil de expressão do gene do AKHr. A partir dos dados de expressão foi observado que o gene do AKHr é mais expresso no quinto e sexto ínstares do estágio larval de desenvolvimento do inseto (Figura 1). Com base nesses resultados o quinto e sexto ínstares foram escolhidos para os experimentos de silenciamento. Um fator que poderia influenciar a eficiência do silenciamento é a quantidade de mRNA do gene alvo presente no organismo após o processamento do dsRNA (TERENIUS et al., 2011).

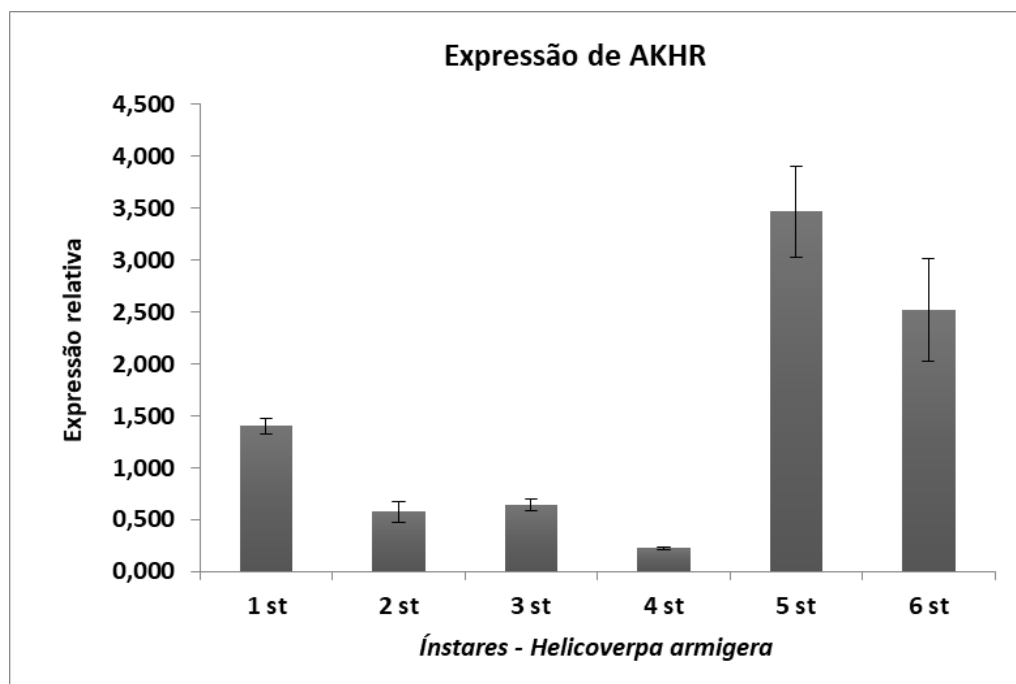


Figura 1. Expressão relativa do gene do receptor de AKH (AKHr) durante o estágio larval de *Helicoverpa armigera*. st: instar.

4.2 Avaliação do silenciamento do gene do AKHr via oral

Várias questões importantes são levantadas ao se projetar experimentos de silenciamento via RNAi, incluindo o tamanho e a concentração do dsRNA, uma vez que esses parâmetros são muito importantes para eficácia do mecanismo de RNAi (JOGA et al., 2016). Para os experimentos de silenciamento do gene do AKHr o fragmento escolhido na síntese do dsRNA foi clonado como descrito no tópico 3.4. O DNA plasmidial dos clones foi digerido para confirmar a presença do fragmento correspondente. Uma PCR convencional foi então realizada com *primers* contendo a sequência para o promotor T7 seguida de posterior síntese do dsRNA específico para o gene AKHr. O dsRNA para o gene do AKHr está representado na figura 2. Na imagem podemos observar fragmentos de aproximadamente 400 pb correspondente ao dsRNA para o AKHr e um fragmento com aproximadamente 150 pb relativo ao dsRNA para o gene GFP, este último utilizado como controle de dsRNA inespecífico. O tamanho adequado do dsRNA que resulta em eficiência do mecanismo de RNAi

varia de acordo com as espécies de insetos (BOLOGNESI et al., 2012). A maioria dos estudos revela que dsRNA variando entre 140 a 500 pb são necessários para o sucesso do mecanismo de RNAi (HUVENNE; SMAGGHE, 2010). O processamento do dsRNA exógeno pela maquinaria de RNAi leva à formação de uma ampla quantidade de siRNAs de aproximadamente 21 nucleotídeos. Estudos utilizando dsRNA maiores que 200 pb demonstram que, após o processamento, esses dsRNA resultam em muitos siRNAs, o que contribui para a eficiência do mecanismo de RNAi (ANDRADE; HUNTER, 2016).

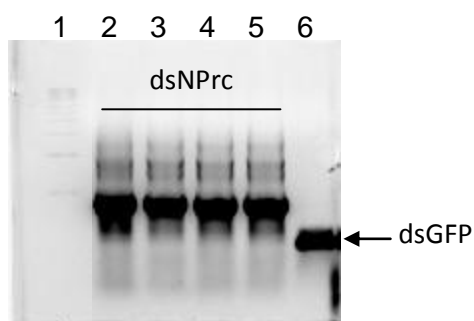


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de dsRNA sintetizado para o gene do AKHr e o dsRNA para o GFP. 1. Marcador 1 Kb Plus (Invitrogen). 2, 3, 4 e 5 dsRNA para o gene AKHr (400 pb). dsRNA para GFP. Foram feitas alíquotas separadas de dsRNA para AKHr utilizando o mesmo DNA resultante da PCR com o DNA plasmidial.

Para os experimentos de silenciamento, inicialmente foi determinado o tempo no qual a ingestão de dsRNA para o gene AKHr resultaria em diminuição da expressão do gene do AKHr. Uma dose de 1000 ng administrada em lagartas de quinto instar através de mistura na dieta foi utilizada para os experimentos. Ao analisar a figura 3 podemos concluir que o melhor tempo para se observar uma diminuição da expressão do gene alvo é 72 horas após a ingestão de dsRNA. Com base nessas observações iniciais, esse foi o tempo selecionado para os experimentos posteriores.

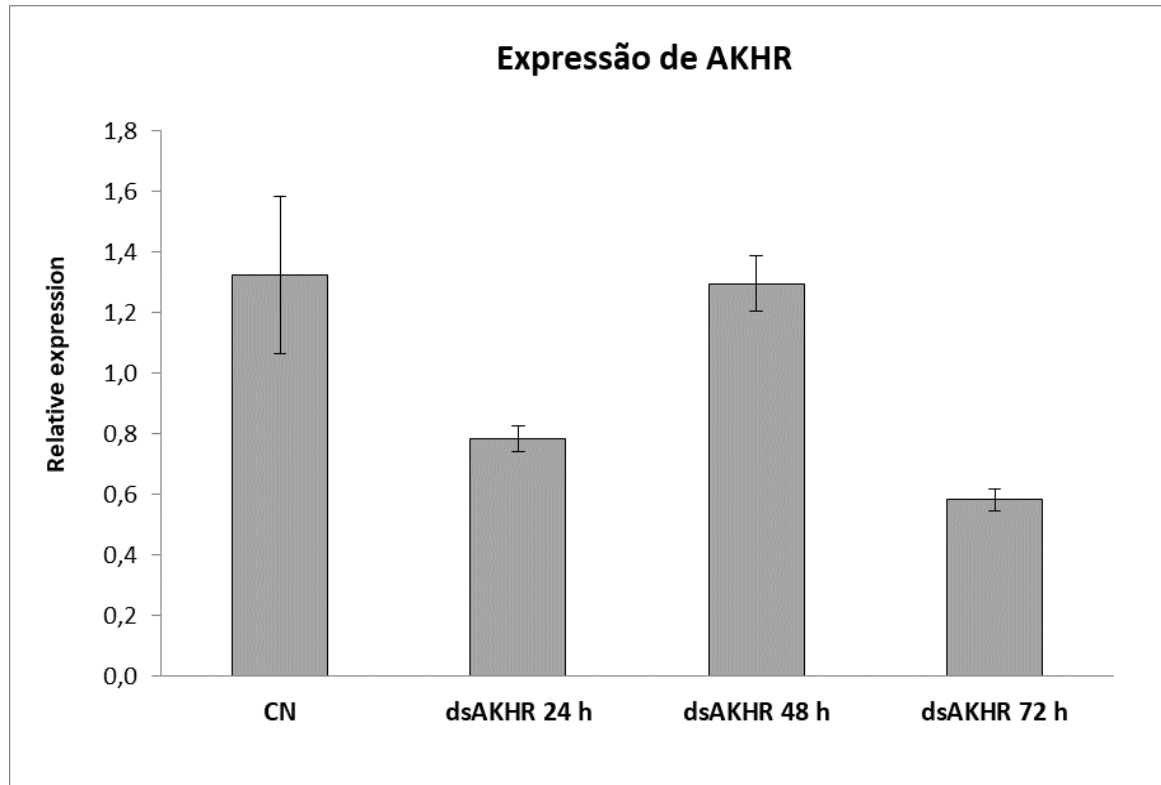


Figura 3. Expressão relativa do gene do AKHr ao longo do tempo após ingestão de dsRNA para o gene em questão. Nesses experimentos foi utilizada uma dose de 1000 ng de dsRNA misturado à dieta para posterior ingestão por lagartas de quinto instar de *H. armigera*.

A concentração ideal deve ser determinada para cada gene e organismo alvo quando o objetivo é induzir o silenciamento. Nesse caso, experimentos de silenciamento foram inicialmente conduzidos utilizando diferentes concentrações de dsRNA visando determinar a concentração na qual a expressão do gene do AKHr seria significativamente diminuída em lagartas de *H. armigera*. Os experimentos foram realizados com dsRNA diluído em água e misturados à dieta para posterior alimentação das lagartas. Como podemos observar na figura 4, a expressão relativa do gene AKHr é menor quanto maior a dose aplicada de dsRNA. O percentual de diminuição na abundância do transcrito foi de 14%, 34% e 56% para as doses de 250, 500 e 1000 ng respectivamente. Dessa forma, a concentração de 1000 ng/ μ L foi utilizada para os experimentos posteriores. Vale ressaltar que a partir dessa concentração apenas 1000 ng são aplicados em cada larva.

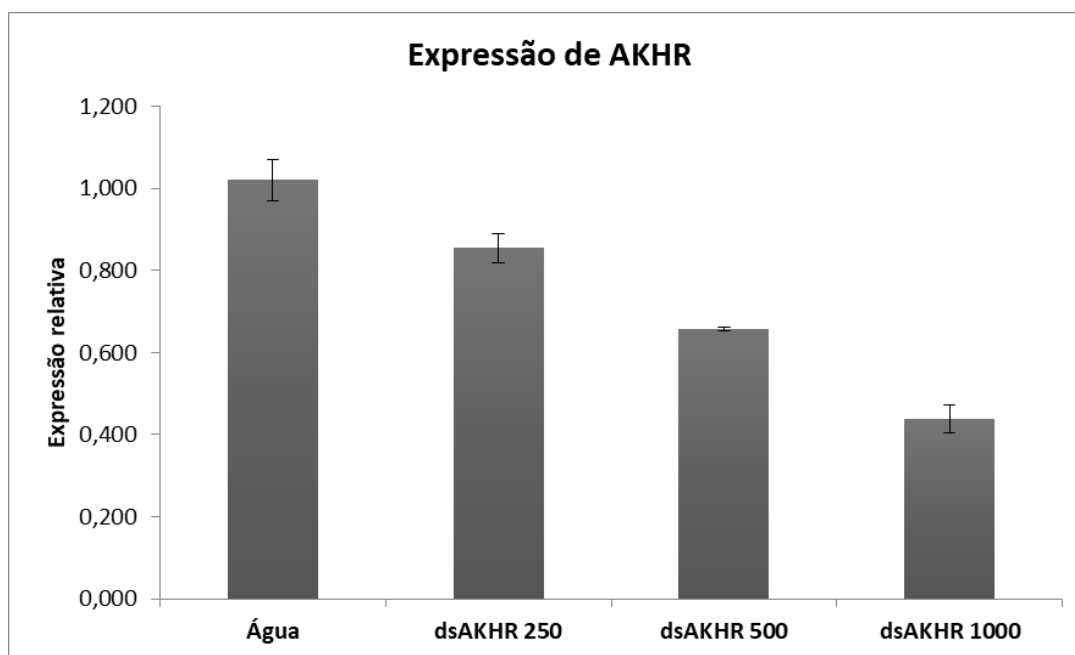


Figura 4. Expressão relativa do gene do AKHR em lagartas de quinto ínstar de *H. armigera* submetidas a experimento de silenciamento utilizando dsRNA para o AKHR. O dsRNA foi solubilizado em água para obtenção das concentrações de 250, 500 e 1000 ng/ μ L de dsRNA. Posteriormente a solução foi misturada à dieta para posterior alimentação das lagartas, de forma que as lagartas ingeriram 250, 500 e 1000 ng de dsRNA cada uma. As lagartas foram coletadas 72 horas após a alimentação para extração de RNA total, síntese de cDNA e RT-qPCR.

A eficiência do silenciamento via RNAi depende também do método de entrega do dsRNA (TERENIUS et al., 2011). A microinjeção vem sendo apontada como uma boa estratégia para estudos de genômica funcional, mas esse método é inviável para o controle de insetos-praga no campo (JOGA et al., 2016). Dessa forma, para ser útil como agente de controle de insetos na agricultura, os métodos mais adequados para a entrega do dsRNA é a ingestão ou a penetração na cutícula do inseto (BAUM; ROBERTS, 2014). A administração via oral de dsRNA também enfrenta algumas barreiras. Por exemplo, a presença de nucleases no intestino de muitos insetos influencia diretamente a viabilidade do silenciamento mediado por RNAi (CHRISTIAENS et al, 2018). Portanto, nanopartículas podem ser utilizadas para reduzir a degradação do dsRNA por nucleases e aumentar a captação celular do dsRNA, a exemplo as nanopartículas de quitosana (ZHANG et al., 2010; JOGA et al., 2016).

Nesse contexto, para avaliar a eficiência de silenciamento do gene do AKHr, experimentos de administração via oral foram realizados utilizando o dsRNA não encapsulado, ou seja, apenas diluído em água, e dsRNA encapsulado com quitosana. Ambos foram adicionados à dieta para posterior ingestão por lagartas de quinto instar. Esse experimento também objetivou verificar se o silenciamento mostrado anteriormente com a dose de 1000 ng seria mais eficiente com o dsRNA encapsulado. Na figura 5 podemos observar que o gene do AKHr apresenta níveis mais baixos de expressão nas lagartas que ingeriram o dsRNA para o AKHr, mas não houve diferença significativa quando comparamos a ingestão de dsRNA não encapsulado e dsRNA encapsulado.

Outros experimentos foram conduzidos com doses maiores de dsRNA (2000 ng e 4000 ng) com aplicação do dsRNA via dieta tanto na forma encapsulada como não encapsulada. Os resultados são mostrados na figura 6. A partir da análise dos dados podemos concluir que a diminuição na expressão do gene do AKHr foi menor em ambas as doses testadas (2000 e 4000 ng) quando comparada à dose 1000 ng levando em consideração a administração de dsRNA não encapsulado. As lagartas alimentadas com dieta contendo o dsRNA encapsulado não mostraram diferença na expressão do gene do AKHr quando comparadas ao seu respectivo controle. Dessa forma, o encapsulamento do dsRNA não altera a eficiência do silenciamento em lagartas do quinto instar de *H. armigera*, pelo menos nas condições testadas.

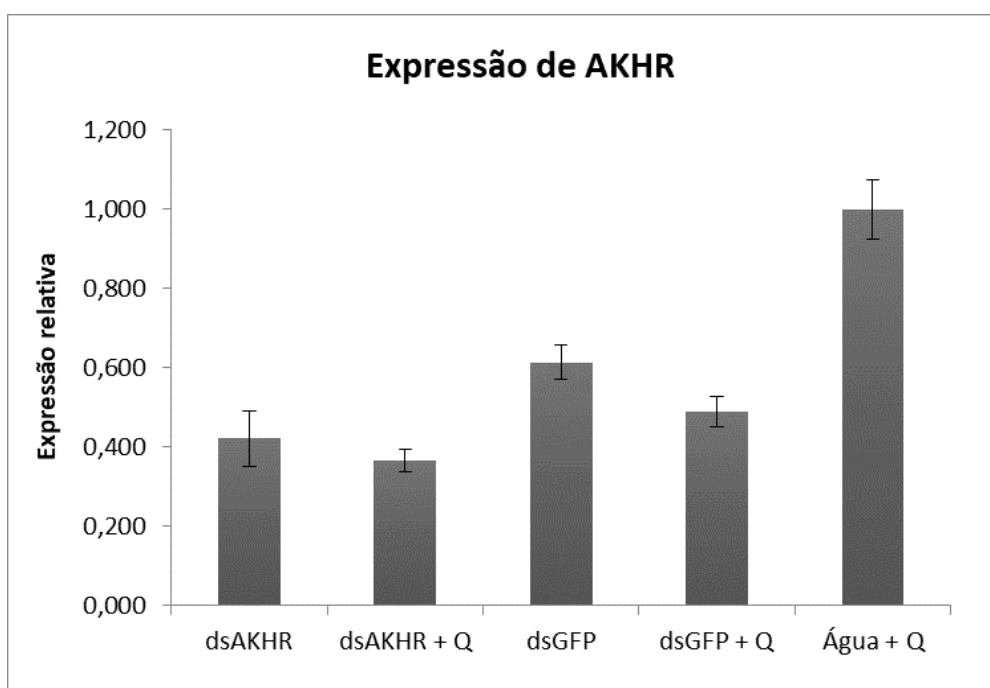


Figura 5. Expressão relativa do gene do AKHr após experimento de silenciamento gênico utilizando dsRNA para AKHr livre e encapsulado (1000 ng) através de alimentação em dieta. Q: Quitosana + surfactante.

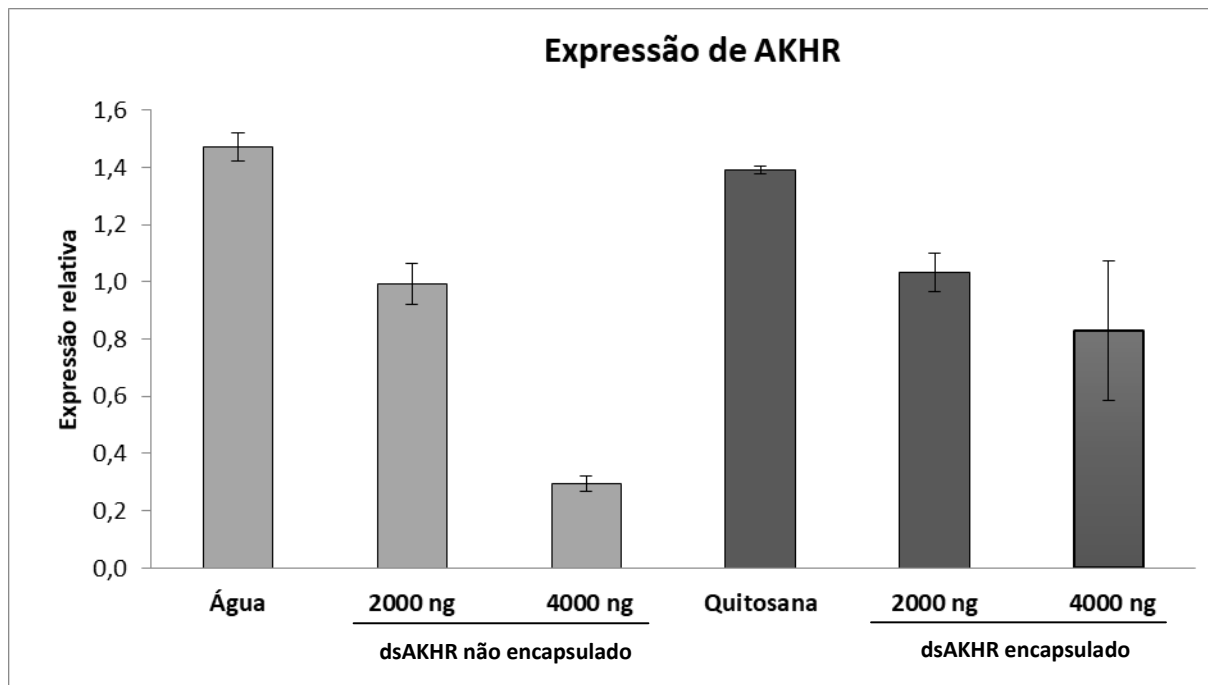


Figura 6. Expressão relativa do gene do AKHr após experimento de silenciamento gênico utilizando dsRNA para AKHr livre e encapsulado (2000 e 4000 ng) através de alimentação em dieta.

4.3 Avaliação do silenciamento do gene do AKHr usando aplicação tópica

Como discutido anteriormente, a estratégia utilizando silenciamento mediado por RNAi somente apresenta efeitos de aplicação prática no controle de insetos na agricultura quando o dsRNA é ingerido ou através de penetração na cutícula do inseto (BAUM; ROBERTS, 2014). Com base nisso, experimentos de silenciamento foram conduzidos através de entrega via aplicação tópica utilizando o dsRNA não encapsulado, uma vez que o encapsulamento não aumentou a eficiência do silenciamento quando utilizamos a via oral. O dsRNA (1000 ng) foi aplicado nas lagartas de quinto e sexto ínstar, na região dorsal. As lagartas foram coletadas depois de 72 horas para análise da expressão do gene do AKHr. Os resultados

desse experimento são mostrados na figura 7. Podemos observar no controle negativo, que a expressão relativa do gene é maior no quinto do que no sexto ínstar.

Em relação ao silenciamento é observado que, em ambos os ínstares, ocorre uma diminuição da expressão de AKHr em relação ao grupo que entrou em contato apenas com água. O mesmo não se observa quando comparamos os grupos de lagartas que receberam dsAKHr com as lagartas tratadas com dsGFP. O percentual de silenciamento para as lagartas de quinto instar foi de 38% e para as lagartas de sexto instar foi de 23% ao compararmos as lagartas tratadas com dsRNA para o gene AKHr com àquelas que receberam apenas água. Levando em consideração que o percentual de silenciamento através de ingestão foi maior (56%) na mesma dose utilizada, a via oral parece ser mais adequada para esses experimentos em *H. armigera* nas condições testadas.

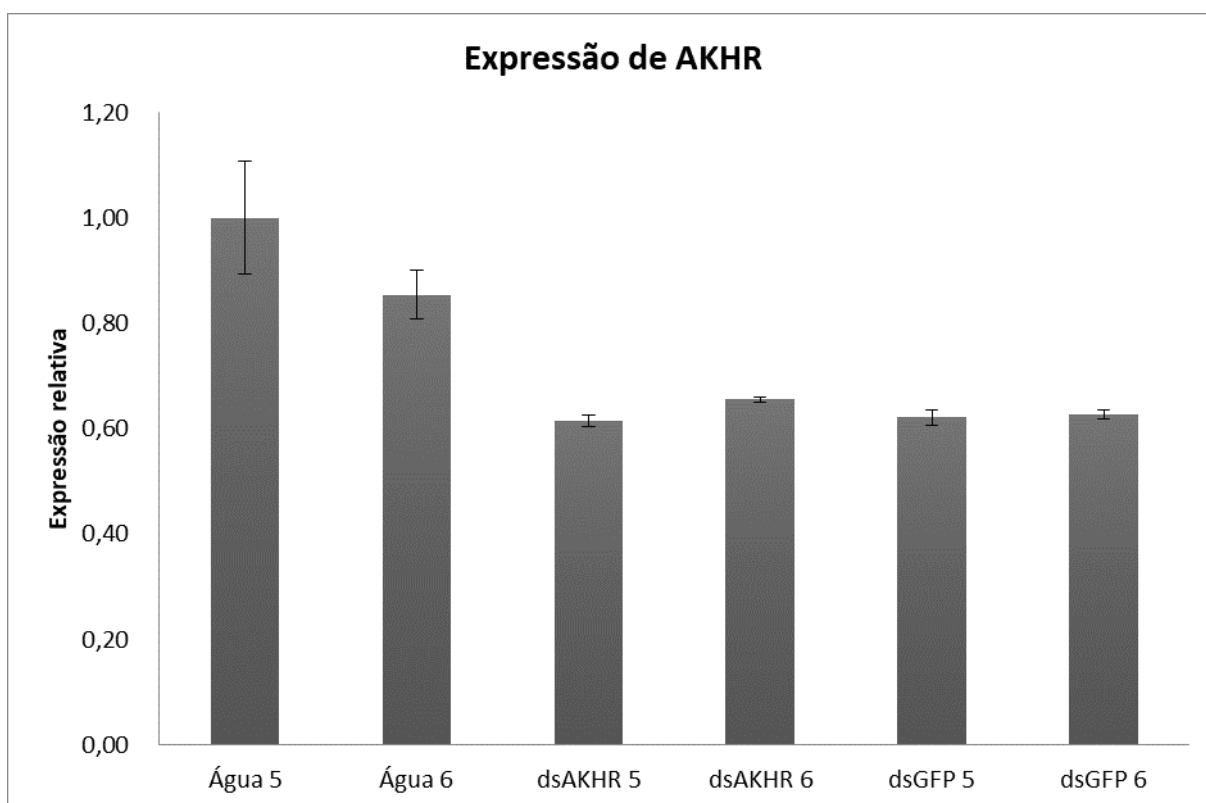


Figura 7. Expressão do gene do AKHr após administração de dsRNA não encapsulado via aplicação tópica. Os números 5 e 6 correspondem, respectivamente às amostras de lagartas do quinto e do sexto ínstar.

4.4 Efeitos do silenciamento no peso dos insetos

Uma vez determinada a melhor forma de entrega do dsRNA para o silenciamento via RNAi em lagartas de *H. armigera*, experimentos de silenciamento foram conduzidos para verificar o efeito do silenciamento no peso das larvas e pupas de *H. armigera*. Todas as doses inicialmente avaliadas quanto ao silenciamento (250, 500, 1000, 2000, 4000 ng) foram testadas e os dados são mostrados nas figuras 8 e 9. Não houve alteração significativa de peso corporal nos diferentes tratamentos avaliados, mesmo com aumento da dose de dsAKHr. Isso foi observado tanto para as lagartas quanto para as pupas.

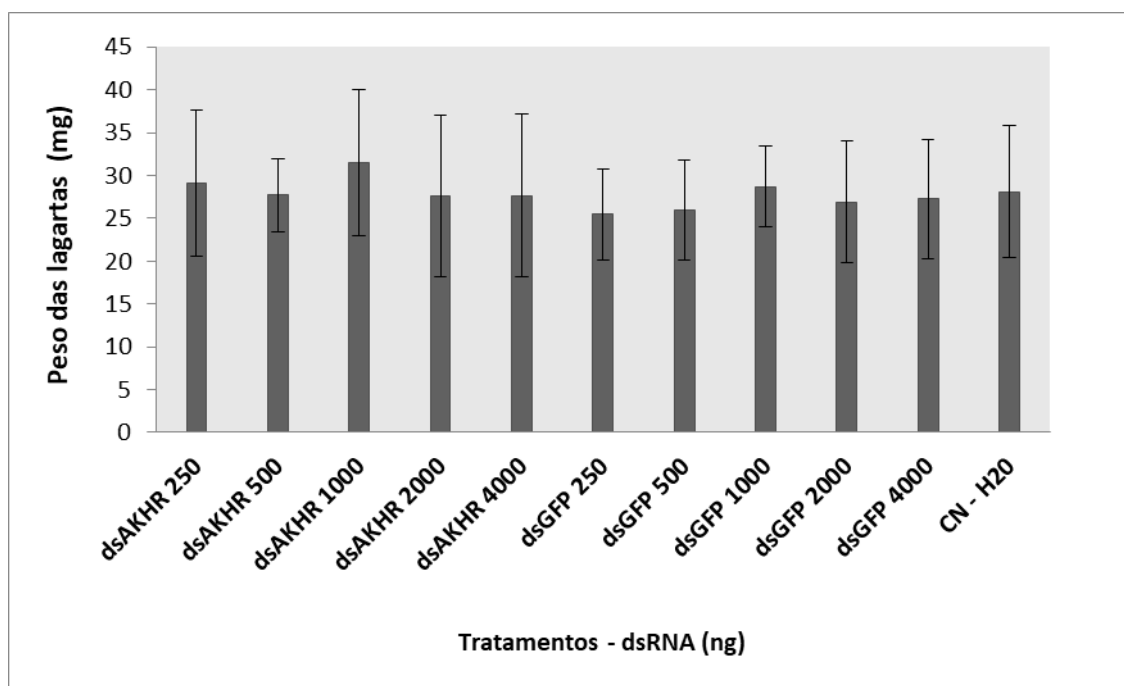


Figura 8. Avaliação do peso corporal em insetos alimentados com diferentes concentrações de dsRNA para o gene do AKHr. As lagartas foram alimentadas no quinto instar.

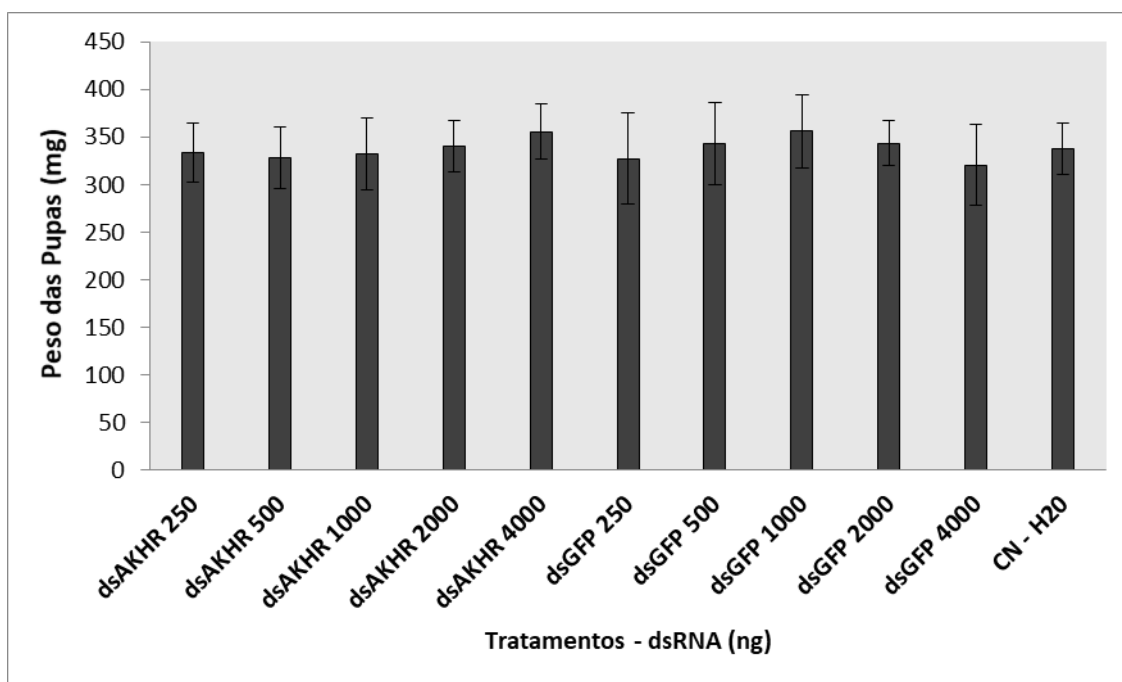


Figura 9. Avaliação do peso corporal em insetos alimentados com diferentes concentrações de dsRNA para o gene do AKHr. As lagartas foram alimentadas no quinto instar e observadas até atingirem a fase de pupa ou adulto.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Apesar de ter sido observada redução na expressão do gene alvo AKHr, os resultados não demonstraram efeitos potencializadores do silenciamento gênico, possivelmente em virtude das propriedades químicas da partícula utilizada para encapsulamento e do pH intestinal. Além disso, foi avaliada a influência dos efeitos do silenciamento no peso dos insetos utilizando dsRNA encapsulado e não encapsulado e foi observado que não houve fenótipo de mortalidade e nem diferença significativa de ganho de peso entre os grupos tratados com dsRNA e os controles.

Desta forma, este trabalho reitera a necessidade de novas estratégias de silenciamento objetivando fenótipos que denotem a efetividade do controle biotecnológico desta praga via silenciamento gênico. Novos experimentos devem ser realizados utilizando maior dose e diferentes tipos de partículas para o encapsulamento do dsRNA.

REFERÊNCIAS

ABAPA - ASSOCIAÇÃO BAIANA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO. Relatório de gestão Biênio 2017-2018. Capítulo 9, Parcerias Estratégicas. 164p. 2018. Consulta em março de 2019. Disponível em: <http://abapa.com.br/wp-content/uploads/2019/02/>.

ABDEL-LATIEF, M.A., HOFFMANN, K.H. (2014). Functional activity of allatotropin and allatostatin in the pupal stage of a holometabolous insect, *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Peptides* 53,172–184. doi: 10.1016/j.peptides.2013.10.007

ABRAPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO. A cadeia do algodão brasileiro: safra 2016/2017: desafios e estratégias. 249p, Brasília-DF, 2017.

AGRAWAL N, DASARADHI PVN, MOHMMED A, MALHOTRA P, BHATNAGAR RK, MUKHERJEE SK, RNA interference: biology, mechanism, and applications. *MicrobiolMol Biol Rev.* 67:657–685 (2003).

AGROFIT/MAPA. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 maio, 2017.

AGUNBIADE TA, SUN W, COATES BS, DJOUAKA R, TAMÒ M, et al. (2013) Development of Reference Transcriptomes for the Major Field Insect Pests of Cowpea: A Toolbox for Insect Pest Management Approaches in West Africa. *Plos One* 8: e79929.

ALI, A., CHOUDHURY, R.A., 2009. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. *Tunisian Journal of Plant Protection, Kef*, v. 4, n. 1, p. 99- 106.

ALVES-BEZERRA, M., I. F. DE PAULA, J. M. MEDINA, G. SILVA-OLIVEIRA, J. S. MEDEIROS, GADE, G., GONDIM, K.C. Adipokinetic hormone receptor gene identification and its role in triacylglycerol metabolism in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 69 (2016) 51-60.

ALVI AHK, SAYYED AH, NAEEM M, ALI M. 2012. Field Evolved Resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in Pakistan. *PLoS One* 7:1-9.

ANDRADE EC; HUNTER WB, RNA interference – natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC), in RNA interference, ed. by Abdurakhmonov IY. In *Tech*, Rijeka, pp.391–409 (2016).

ANDREWS.; S.; KRUEGER.; F.; SECONDS-PICHON.; A.; BIGGINS.; F.; WINGETT.; S.. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. *Babraham Bioinformatics*. 2012.

APHIS. Animal and Plant Health Inspection Service. For information and action, 2015. Disponível em: https://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/owb/downloads/DA-2015-43.pdf>. Acesso em: 26 mai. 2018.

ARAÚJO, A. C. Luta biológica contra *Heliothis armigera* no ecossistema agrícola “tomate de indústria”. 1990 Tese de doutorado em Entomologia, Universidade de Évora, Évora 1990.

ARRESE, E. L., SOULAGES, J. L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 207–225.

ATTARDO, G. M., BENOIT, J. B., MICHALKOVA, V., YANG, G., ROLLER, L., BOHOVA, J., et al. (2012). Analysis of lipolysis underlying lactation in the tsetse fly, *Glossina morsitans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 360–370.

AUDSLEY N, DOWN RE. 2015. G protein coupled receptors as targets for next generation pesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 67:27–37

ÁVILA, J. C.; VIVIAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. Circular Técnica. 2013. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/caravana/pdfs/FINAL_Circular_Tecnica_23_CPAO\(1\).pdf](http://www.cnpso.embrapa.br/caravana/pdfs/FINAL_Circular_Tecnica_23_CPAO(1).pdf)>. Acesso em: 19 jun., 2019.

AZAMBUJA, R. Bioecologia De *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e seu Controle Microbiano e Biotecnológico. Tese em entomologia e conservação da biodiversidade. Dourados – MS. 2016.

BABICKI S, ARNDT D, MARCU A, LIANG Y, GRANT JR, MACIEJEWSKI A, et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic acids research*. 2016; 44(W1):W147-W53.

BALLY J, MCINTYRE GJ, DORAN RL, LEE K, PEREZ A, JUNG H, et al. In-Plant Protection against *Helicoverpa armigera* by Production of Long hpRNA in Chloroplasts *Frontiers in Plant Science*. 2016; 1453.

BALLY J, JUNG H, MORTIMER C, NAIM F, ILLIPS JG, HELLENS R, et al. The Rise and Rise of *Nicotiana benthamiana*: A Plant for All Reasons. *Annual Review of Phytopathology*. 2018; 56: 405-426.

BAULCOMBE, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356–363.

BAUM, J. A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G. R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O. et al, Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotech*, 25:1322-1326, 2007.

BAUM, J.A., ROBERTS, J.K., 2014. Chapter Five - Progress Towards RNAi-Mediated Insect Pest Management, in: Gill, T.S.D. and S.S. (Ed.), *Advances in Insect Physiology, Insect Midgut and Insecticidal Proteins*. Academic Press, pp. 249–295.

BEDNÁŘOVÁ A, KODRÍK D, KRISHNAN N. Knockdown of adipokinetic hormone synthesis increases susceptibility to oxidative stress in *Drosophila*--a role for dFoxO? *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2015

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

BETTENCOURT, R., TERENIUS, O., FAYE, I., 2002. Hemolin gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia* pupae is lethal to next generation embryos. *Insect Molecular Biology* 11, 267–271.

BHONWONG A, STOUT MJ, ATTAJARUSIT J, TANTASAWAT P. Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) and beet armyworm (*Spodoptera exigua*). *J. Chem. Ecol.* 2009; 32, 28–38.

BIL, M., BROECKX, V., LANDUYT, B., HUYBRECHTS, R., 2014. Differential peptidomics highlights adipokinetic hormone as key player in regulating digestion in anautogenous flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 208, 49-56.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30:2114-2120, 2014.

BOLOGNESI, R. et al. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLoS One* 7, e47534 (2012).

BOULOGNE I, PETIT P, OZIER-LAFONTAINE H, DESFONTAINES L, LORANGER-Merciris G. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*. 2012; 10, 325–347.

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

BRAVO A, LIKITVIVATANAVONG S, GILL SS; SOBERÓN M (2011) *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41: 423-431.

BRAY NL, PIMENTEL H, MELSTED P, PACHTER L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature biotechnology*. 2016; 34(5):525-527.

BRETSCHNEIDER A, HECKEL DG, VOGEL H. Know your ABCs: characterization and gene expression dynamics of ABC transporters in the polyphagous herbivore *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2016; 72, 1-9.

BUENO, R. C. O. F.; YAMAMOTO, P. T.; CARVALHO, M. M.; BUENO, N. M. Occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) on citrus in the state of Sao Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 36, p. 520-523, 2014.

BUÉS R, BOUVIER JC, BOUDINHON L. 2005. Insecticide resistance and mechanisms of resistance to selected strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in the south of France. *Crop Protection* 24: 814-820.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 29, n. 1, p. 23-39, 2002.

CABI. Crop Protection Compendium. *Helicoverpa armigera*. 2014. Disponível em: <<http://www.cabi.org/cpc/datasheet/26757>>. Acesso em 14 nov. 2018.

CAERS, J., VERLINDEN, H., ZELS, S., VANDERSMISSEN, H.P., VUERINCKX, K., SCHOOF, L., 2012. More than two decades of research on insect neuropeptide GPCRs: an overview. *Front. Endocrinol.* 3, 151.

CALLA B, NOBLE K, JOHNSON RM, WALDEN KK, SCHULER MA, ROBERTSON HM, et al. Cytochrome P450 diversification and hostplant utilization patterns in specialist and generalist moths: Birth, death and adaptation. 2017; 26(21):6021-35.

CARTHEW RW; SONTHEIMER EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642–655 (2009).

CASTIGLIONI, E.; CLÉRISON, R. P.; CHIARAVALLE, W.; JONAS, A. A.; UGALDE, G.; JERSON, V. C. G. Primer registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) en soja, en Uruguay. *Agrociencia, Montevideo*, v. 20, n. 1, p.31-35, 2016.

CELORIO-MANCERA MD, AHN SJ, VOGEL H, HECKEL DG. Transcriptional responses underlying the hormetic and detrimental effects of the plant secondary metabolite gossypol on the generalist herbivore *Helicoverpa armigera*. *BMC Genomics*.2011; 12, 575.

CELORIO-MANCERA MP, HECKEL DG, VOGEL H. Transcriptional analysis of physiological pathways in a generalist herbivore: responses to different host plants and plant structures by the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Entomol Exp Appl.* 2012; 144: 123–133.

CELORIO-MANCERA, M.D.L.P., WHEAT, C.W., VOGEL, H., SÖDERLIND, L., JANZ, N., NYLIN, S. 2013. Mechanisms of macroevolution: polyphagous plasticity in butterfly larvae revealed by RNA-Seq. *Mol. Ecol.* 22, 4884e4895.

CEPEA/USP. PIB do agronegócio brasileiro de 1996 a 2018. Disponível em <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em 10/10/2019.

- CHANDRA, G. S.; ASOKAN, R.; MANAMOHAN, M.; KUMAR, N. K. K.; SITA, T. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Molecular Biology*, Vol 48, Issue 6, pp 813–822, 2014
- CHANG, Z.; SHEN, Q-Q. The complete mitochondrial genome of the navel orangeworm *Amyelois transitella* (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Mitochondrial DNA*. Vol. 27, Issue 6, pages 4561-4562, 2016.
- CHELLIAH A, GUPTA GP, KARUPPIAH S, KUMAR PA. 2011. Chimeric d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* with increased activity against *Helicoverpa armigera*. *International Journal of Tropical Insect Science* 31: 59-68.
- CHEN S, ELZAKI MEA, DING, C, LI, ZF, WANG, J, ZENG, RS, et al. Plant allelochemicals affect tolerance of polyphagous lepidopteran pest *Helicoverpa armigera* (Hübner) against insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2019; 154, 32–38.
- CHEN, J., ZHANG, D., YAO, Q., ZHANG, J., DONG, X., TIAN, H., et al. (2010). Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*, 19, 777–786.
- CHIAPPISI, L.; GRADZIELSKI, M. Co-assembly in chitosan-surfactant mixtures: thermodynamics, structures, interfacial properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 220, 92 - 107, 2015.
- CHO S, MITCHELL A, MITTER C, REGIER J, MATTHEWS M, ROBERTSON R. Molecular phylogenetics of heliothine moths (Lepidoptera: Noctuidae: Heliotioninae), with comments on the evolution of host range and pest status. *Systematic Entomology*, 2008; 581–594.
- CHRISMAN JDR, KOIFMAN S, DE NOVAES SARCINELLI P, MOREIRA JC, KOIFMAN RJ, et al. (2009) Pesticide sales and adult male cancer mortality in Brazil. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212: 310–321.
- CHRISTIAENS, O., DZHAMBAZOVA, T., KOSTOV, K., ARPAIA, S., JOGA, M.R., URRU, I., SWEET, J., SMAGGHE, G., 2018. Literature review of baseline information on RNAi to support the environmental risk assessment of RNAi based GM plants. *EFSA Support. Publ.* 15. p.142.
- CHRISTIAENS, O.; PRENTICE, K.; PERTRY, I.; GHISLAIN, M.; BAILEY, A.; NIBLETT, C.; GHEYSEN, G.; SMAGGHE, G. RNA interference: a promising biopesticide strategy against the African Sweetpotato Weevil *Cylas brunneus*. *Nature, Scientific Reports*, 6:38836, 2016.
- COELHO.; R. R.; ANTONINO DE SOUZA JR.; J. D.; FIRMINO.; A. A. P.; MACEDO.; L. L. P; FONSECA.; F. C. A.; TERRA.; W. R.; ENGLER.; G.; ENGLER.; J. A.; DA SILVA.; M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ.; M. F. Vitellogenin knockdown strongly affects cotton boll weevil egg viability but not the number of eggs laid by females. *Meta Gene*. v. 9.; p. 173-180, 2016.
- CONESA, A.; GÖTZ, S. Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*, 619832, 2008.
- CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 15;21(18):3674-6, 2005.
- CONSORTIUM GO. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic acids research*. 2004; 32(suppl_1):D258-D261.
- CRAVA CM, BRÜTTING C, BALDWIN IT. Transcriptome profiling reveals differential gene expression of detoxification enzymes in a hemimetabolous tobacco pest after feeding on jasmonate-silenced *Nicotiana attenuata* plants. *BMC Genomics*. 2016; 17(1):1005.

CRUSOE, M. R.; ALAMELDIN, H. F.; AWAD, S.; BOUCHER, E.; CALDWELL, A.; CARTWRIGHT, R. The khmer software package: enabling efficient nucleotide sequence analysis. *F1000 Research*, 4, 2015.

CUNNINGHAM JP; ZALUCKI MP (2014) Understanding heliothine (Lepidoptera: Heliothinae) pests: what is a host plant? *Journal of Economic Entomology* 107: 881–896.

CUNNINGHAM, J. P., ZALUCKI, M. P., WEST, S. A., 1999. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. *Bulletin of Entomological Research*, v. 89, n. 3, p. 201-207.

CUNNINGHAM, J.P., JALLOW M.F.A., WRIGHT, D.J., ZALUCKI, M.P. Learning in host selection in *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Anim Behav.* 1998 Jan;55(1):227-34.

CZEPAK C, ALBERNAZ KC, VIVAN LM, GUIMARÃES HO, CARVALHAIS T (2013a) Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 43:110-113

CZEPAK C, VIVAN LM, ALBERNAZ KC (2013b) Pragas da vez. *Cultivar* 167: 20-27 Degrande PE, Omoto C (2013) Pragas: Estancar prejuízos. *Cultivar* 167:30-34.

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

CZEPAK, C.; ÁVILA, C. J.; VIVAN, L. M.; ALBERNAZ, K. C. Praga da vez. *Revista Cultivar Grandes Culturas*, Pelotas, n. 176, p. 4-11, 2013b. Edição especial.

DASS, C. R., AND CHOONG, P. F. (2008). Chitosan-mediated orally delivered nucleic acids: a gutful of gene therapy. *J. Drug Target.* 16, 257–261.

DEGRANDE PE, OMOTO C. 2013. Pragas: Estancar prejuízos. *Cultivar* 167:30-34.

DESPRES L, DAVID J, GALLET C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals *Trends Ecol. Evol.* 2007; 22, 298-307.

DIAS, R. Limitação natural de *Helicoverpa armigera* (Hbn) em tomate indústria no Ribatejo: parasitoides e predadores. Relatório (Trabalho de Graduação em Engenharia Agrônômica) - Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2005. 70 p.

DODOU K. Investigations on gossypol: past and present developments. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2005; 14(11), 1419–1434.

DUA, I.S., KUMAR, V. AND BHAVNEET, D.E.A. (2006) Genetically modified cotton and its biosafety concerns: a review. In *Current Concepts in Botany* (Mukerji, K.G., Manoharachary, C., I.K. International Publishing House, New Delhi, India.), ed. pp. 447-459.

EMBRAPA (2013) Ações emergenciais propostas pela Embrapa para o manejo integrado de *Helicoverpa* spp. em áreas agrícolas. 19p. Available at: <https://www.embrapa.br/ALERTA-HELICOVERPA> (accessed 21 November 2016).

EMBRAPA. Visão 2030: o futuro da agricultura brasileira. Brasília, DF: Embrapa, 2018. 212 p. : il. color; 18,5 cm x 25,5 cm.

EMRICH, S. J.; BARBAZUK, W. B.; Li, L; SCHNABLE, P. S. Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome Research*, New York, v.17, p.69–73, 2007.

EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization *Helicoverpa zea*. In: SMITH, I. M. et al. (Eds.). *Quarantine pests for Europe*. 2. ed. Wallingford: CAB International, 1996. p. 1-6.

EPPO - EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. Data sheets on quarantine organisms n° 110: *Helicoverpa armigera*. Paris, (Bulletin, 11), 1981.

EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization. Data sheets on quarantine pests: *Helicoverpa armigera*. 2007. Disponível em <http://www.eppo.int/QUARANTINE/insects/Helicoverpa_armigera/HELIAR_ds.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2018.

FARIAS JR, ANDOW DA, HORIKOSHI RJ, SORGATTO RJ, FRESIA P, DOS SANTOS AC, OMOTO C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Prot.* 2014; 64: 150–158.

FATHIPOUR, Y.; SEDARATIAN, A. Integrated Management of *Helicoverpa armigera* in Soybean Cropping Systems. In: EL-SHEMY, H. (Ed.). Soybean - Pest Resistance. Cairo: InTech, 2013, p. 231-280.

FERRY N, EDWARDS MG, GATEHOUSE JA, GATEHOUSE AMR. Plant–insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Curr Opin Biotechnol*

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, p. 806-811, 1998.

FIRMINO, A. A. P.; FONSECA, F. C. D. A.; DE MACEDO, L. L. P.; COELHO, R. R.; ANTONINO DE SOUZA JR, J. D.; TOGAWA, R. C.; SILVA-JUNIOR, O. B.; PAPPAS-JR, G. J.; DA SILVA, M. C. M.; ENGLER, G.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Transcriptome Analysis in Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA Interference in Insect Pests. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, e85079, 2013.

FITT, G. P. The ecology of Heliothis in relation to agroecosystems. *Annual Review of Entomology*, Palo Alto, v. 34, p. 17-52, 1989.

FITT, G. P.; DILLON, M. L.; HAMILTON, J. G. Spatial dynamics of *Helicoverpa* populations in Australia: simulation modelling and empirical studies of adult movement. *Computers and electronics in agriculture*, v. 13, n. 2, p. 177–192, 1995.

FUTUYMA DJ, AGRAWAL AA. Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106, 18054–18061.

GÄDE, G., MARCO, H.G., 2009. Peptides of the adipokinetic hormone/red pigmentconcentrating hormone family with special emphasis on Caelifera: primary sequences and functional considerations contrasting grasshoppers and locusts. *Gen. Comp. Endocrinol.* 162, 59-68.

GÁLIKOVÁ, M.; DIESNER, M.; KLEPSATEL, P.; HEHLERT, P.; XU, Y.; BICKMEYER, I.; PREDEL, R.; KÜHNLEIN, R.P. Energy homeostasis control in *Drosophila* adipokinetic hormone mutants. *Genetics* 2015, 201, 665–683.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA-NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI-FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; L.C., M.; LOPES, J. R. L.; OMOTO, C., *Entomologia Agrícola*. 2 ed.; FEALQ: Piracicaba, v. 1, p. 649. 2002.

GARCIA RA, MACEDO LLP, CABRAL DO NASCIMENTO D, GILLET F-X, MOREIRA-PINTO CE, FAHEEM M, BASSO AMM, SILVA MCM, GROSSI-DE-SA MF (2017) Nucleases as a barrier to gene silencing in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. *PLoS ONE* 12(12): e0189600.

GARCIA, R. A. Estratégias para aumentar a eficiência de dsRNA no silenciamento gênico no bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis*. Tese. Brasília-DF. 2019.

GEBERT LFR, MacRae IJ (2019) Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell* 20:21–37.

- GOG L, VOGEL H, HUM-MUSSER SM, TUTER J, MUSSER RO. Larval *Helicoverpa zea* transcriptional, growth and behavioral responses to nicotine and *Nicotiana tabacum* Linus. *Insects*. 2014; 5, 668-688, doi:10.3390/insects5030668.
- GOUIN A, BRETAUDEAU A, NAM K, GIMENEZ S, AURY JM, DUVIC B et al. Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges. *Scientific Reports*. 2017, 7:11816 . doi:10.1038/s41598-017-10461-4.
- GRABHERR MG, HAAS BJ, YASSOUR M, LEVIN JZ, THOMPSON DA, AMIT I, et al. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature biotechnology*. 2011; 29(7):644.
- GUEDES, J. V. C.; ARNEMANN, J. A.; PERINI, C. R.; ARRUE, A.; ROHRIG, A. Manejar ou perder. *Revista Cultivar Grandes Culturas, Pelotas*, n. 176, p. 12-16, 2013.
- GUERRA, W. D., GUERRA, A. L. L. D.; RIBAS, L. N.; GONÇALVES, R. M.; MASTRANGELO, T. Molecular identification of a parasitic fly (Diptera: Tachinidae) from the introduced *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Entomology, Ornithology & Herpetology, Los Angeles*, v. 3, p. 1-4, 2014.
- GUO, Y. Y. Progress in the researches on migration regularity of *Helicoverpa armigera* and relationships between the pest and its host plants. *Acta Entomologica Sinica, Beijing*, v. 40, n. 1, p. 1-6, 1997.
- HAAS, B. J; PAPANICOLAOU, A.; YASSOUR, M.; GRABHERR, M.; BLOOD, P. D.; BOWDEN, J.; COUGER, M. B.; ECCLES, D.; LI, B.; LIEBER, M.; MACMANES, M. D.; OTT, M.; ORVIS, J.; POCHET, N.; STROZZI, F.; WEEKS, N.; WESTERMAN, R.; WILLIAM, T.; DEWEY, C. N.; HENSCHHEL, R.; LEDUC, R. D.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8):1494-512, 2013.
- HAN, Z.G., GUO, W.Z., SONG, X.L. AND ZHANG, T.Z. (2004) Genetic mapping of EST-derived microsatellites from the diploid *Gossypium arboreum* in allotetraploid cotton. *Mol. Genet. Genomics*, 272, 308-327.
- HANNON, G.J., 2002. RNA interference. *Nature* 418, 244–251.
- HE, B., CHU, Y., YIN, M., MÜLLEN, K., AN, C., AND SHEN, J. (2013). Fluorescent nanoparticle delivered dsRNA toward genetic control of insect pests. *Adv. Mater. Weinheim*. 25, 4580–4584
- HECKEL D.G. Ecology. Insecticide resistance after Silent spring, *Science* 337 (2012) 1612–1614.
- HELLEMANS J, MORTIER G, DE PAEPE A, et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*. 2007; 8: R19.
- HEMATI SA, NASERI B, RAZMJOU J. 2013. Reproductive performance and growth indices of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on various host plants. *Journal Crop Protection* 2: 193-208.
- HERRERO-VANRELL, R., RINCÓN, A. C., ALONSO, M., REBOTO, V., MOLINA-MARTINEZ, I. T., AND RODRÍGUEZ-CABELLO, J. C. (2005). Self-assembled particles of an elastin-like polymer as vehicles for controlled drug release. *J. Control. Release* 102, 113–122. <http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=600>. Consultado em 09-02-2018.
- HOWE GA, JANDER G. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*. 2008; 59, 41–66.

HUANG, J. H., BELLÉS, X., AND LEE, H. J. (2011). Functional characterization of hypertrehalosemic hormone receptor in relation to hemolymph trehalose and to oxidative stress in the cockroach *Blattella germanica*. *Front. Endocrin. (Lausanne)* 2:114.

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

ISABEL, G., MARTIN, J.R., CHIDAMI, S., VEENSTRA, J.A., ROSAY, P., 2005. AKH producing neuroendocrine cell ablation decreases trehalose and induces behavioral changes in *Drosophila*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R531–R538.

JAYARAJ, S., REED, W., KUMBLE, V., 1981. Biological and ecological studies of *Heliothis*. In *Proceedings of the International Workshop on Heliothis Management*. ICRISAT Center, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Patancheru, India, 15-20 November, p. 17-28.

JIN M, LIAO C, FUX, HOLDBROOKR, WU K and XIAO Y. Adaptive regulation of detoxification enzymes in *Helicoverpa armigera* to different host plants. *Insect Molecular Biology* (2019) 1–9 doi: 10.1111/imb.12578.

JOGA MR, ZOTTI MJ, SMAGGHE G, CHRISTIAENS O. RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. *Front Physiol.* 2016 Nov 17;7:553. eCollection 2016.

JORGENSEN RA, CLUSTER PD, ENGLISH J, QUE Q, NAPOLI CA (1996) Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol* 31: 957–973.

KANEHISA M, GOTO S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research.* 2000; 28(1):27-30.

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

KESSLER A, BALDWIN IT. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol* 2002, 53:299–328.

KNORR E, FISHILEVICH E, TENBUSCH L, FREY MLF, RANGASAMY M, BILLION A, WORDEN SE, GANDRA P, ARORA K, LO W, SCHULENBERG G, VALVERDE-GARCIA P, VILCINSKAS A, NARVA KE. Gene silencing in *Tribolium castaneum* as a tool for the targeted identification of candidate RNAi targets in crop pests. *Sci Rep.* 2018 Feb 1;8(1):2061.

KONUMA, T., MOROOKA, N., NAGASAWA, H., AND NAGATA, S. (2012). Knockdown of the adipokinetic hormone receptor increases feeding frequency in the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus*. *Endocrinology* 153, 3111–3122.

KRANTHI, S.; WANJARI, R. R.; ALA, S. S.; RUSSELL, C. D. A. Insecticide resistance in five major insect pests of cotton in India. *Crop Protection* 21: 449-460. 2002.

KREMPL C, SPORER T, REICHELT M, AHN SJ, HEIDEL-FISCHER H, VOGEL H, et al. Potential detoxification of gossypol by UDP glycosyltransferases in the two Heliothine moth species *Helicoverpa armigera* and *Heliothis virescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 2016; 49-57 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.02.005>.

KRISHNAMOORTHY, A. Exploitation of egg parasitoids for control of potential pests in vegetable ecosystems in India. *Comunicata Scientiae, Bom Jesus*, v. 3, n. 1, p. 1-15, 2012.

KRITICOS, D. J.; OTA, N.; HUTCHISON, W. D.; BEDDOW, J.; WALSH, T.; TAY, W. T.; BORCHERT, D. M.; PAULA-MOREAS, S. V.; CZEPAK, C.; ZALUCKI, M. P. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: is it just a matter of time? *PLoS ONE*, San Francisco, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0119618.

KUMAR, S.; KANAKACHARI, M.; GURUSAMY, D.; KUMAR, K.; NARAYANASAMY, P.; VENKATA, P. K.; SOLANKE, A.; GAMANAGATTI, S.; HIREMATH, V.; KATAGERI, I. S.; LEELAVATHI, S.; KUMAR, P. A.; REDDY, V. S.; KRANTHI, K. R.; JADHAV, D. R. Genome-wide transcriptomic and proteomic analyses of bollworm-infested developing cotton bolls revealed the genes and pathways involved in the insect pest defence mechanism. *Plant Biotechnology Journal* (2016) 14, pp. 1438–1455 doi: 10.1111/pbi.12508.

LAMMERS, J. W.; MACLEOD, A. Report of a pest risk analysis: *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808). 2007. Disponível em: <<http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/helicoverpa.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

LEE, G.H., PARK, J.H., 2004. Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 311e323.

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

LEITE NA, CORREA AS, MICHEL AP, ALVES-PEREIRA A, PAVINATO VAC, ZUCCHI MI, OMOTO C. Pan-american similarities in genetic structures of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) with implications for hybridization. *Environmental Entomology*. 2017; 1–11. doi: 10.1093/ee/nvx088.

LI H, BOUWER G. 2014. Evaluation of the synergistic activities of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 121: 7-13.

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*, 12(1), 323, 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, p. 701-711, 2007.

LIU Z, GONG P, LI D, WEI W. 2010. Pupal diapause of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) mediated by larval host plants: pupal weight is important. *Journal of Insect Physiology* 56: 1663-1670.

LIU Z, LI D, GONG P, WU K. Life table studies of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae), on different host plants. *Environmental Entomology*. 2004;33:1570–1576.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. Analysis of Relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. *Methods* 25:402-408, 2001.

LOMATE PR, DEWANGAN V, MAHAJAN NS, KUMAR Y, KULKARNI A, WANG L, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analyses suggest the participation of endogenous protease inhibitors in the regulation of protease gene expression in *Helicoverpa armigera*. 2018; 17(7):1324-36.

LORENZ, M. W., AND GÄDE, G. (2009). Hormonal regulation of energy metabolism in insects as a driving force for performance. *Integr. Comp. Biol.* 49, 380–392.

LUKEFAHR MJ, FRYXELL PA. Content of gossypol in plants belonging to Genera related to cotton. *Econ Bot* 1967, 21(2):128-131.

MACEDO.; L. L. P.; ANTONINO-DE-SOUZA JÚNIOR.; J. D.; COELHO.; R. R.; FONSECA.; F. C. A.; FIRMINO.; A. A. P.; SILVA.; M. C. M.; FRAGOSO.; R. R.; ALBUQUERQUE.; E. V. S.; SILVA.; M. S.; ENGLER.; J. A.; TERRA.; W. R.; GROSSI-DE-SA.; M. F. Knocking down chitin synthase 2 by RNAi is lethal to the cotton boll weevil. *Biotechnology Research and Innovation.*; v. 1.; p. 72-86.; 2017.

- MALKA O, SANTOS-GARCIA D, FELDMESSER E, SHARON E, KRAUSE-SAKATE R, DELATTE H, et al. Species-complex diversification and host-plant associations in *Bemisia tabaci*: A plant-defence, detoxification perspective revealed by RNA-Seq analyses. *Molecular ecology*. 2018; 27(21): 4241-4256. doi: 10.1111/mec.14865.
- MAO YB, CAI WJ, WANG JW, HONG GJ, TAO XY, WANG LJ, et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnol*. 2007; 25, 1307.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. PROJEÇÕES DO AGRONEGÓCIO Brasil 2016/17 a 2026/27 Projeções de Longo Prazo. 8ª edição. Biblioteca Nacional de Agricultura – BINAGRI, 2017.
- MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. v. 9, p. 387-402, 2008.
- MARTIN, J. A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. *Nature Genetics*. v. 12, 2011.
- MEI, M., SYED, N.H., GAO, W., THAXTON, P.M., SMITH, C.W., STELLY, D.M. AND CHEN, Z.J. (2004) Genetic mapping and QTL analysis of fiber-related traits in cotton (*Gossypium*). *Theor. Appl. Genet.* 108, 280-291.
- MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double stranded RNA. *Nature*, 431:343-349, 2004.
- METSALU, T.; VILO, J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic acids research*, 43(W1), W566-W570, 2015.
- MIRANDA, J. E. Manejo de pragas do algodoeiro no Cerrado Brasileiro. Campina Grande: Embrapa Algodão, 22p, 2006.
- MORTAZAVI, A., WILLIAMS, B. A., MCCUE, K., SCHAEFFER, L., & WOLD, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods*, 5(7), 621-628.
- MURÚA MG, SCALORA FS, NAVARRO FR, CAZADO LE, CASMUZ A, VILLAGRÁN ME, LOBOS E, GASTAMINZA G. 2014. First Record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. *Florida Entomologist* 97: 854-856.
- NARVA, K. E.; SIEGFRIED, B. D.; STORER, N. P. Transgenic approaches to western corn rootworm control. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 136, 135-162. 2013.
- NASERI B, FATHIPOUR Y, MOHARRAMIPOUR S, HOSSEININAVEH V. 2011. Comparative reproductive performance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) reared on thirteen soybean varieties. *Journal of Agricultural Science and Technology* 13: 17-26.
- NASERI B, FATHIPOUR Y, MOHARRAMIPOUR S, HOSSEININAVEH V. Life table parameters of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on different soybean cultivars. *Journal of Entomological Society of Iran*. 2009; 29(1), 25-40, ISSN 0259-9996.
- NORTH AMERICAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. 2014. Detection of Old World Bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Puerto Rico. Disponível em:
- OERKE, E.C. (2006) Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144, 31–43.
- OLIVEIRA CM, AUAD AM, MENDES SM, FRIZZAS MR (2014) Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. *Crop Protection* 56: 50–54.
- PAL, P.; PAL, A. Surfactant-modified chitosan beads for cadmium ion adsorption. *International Journal of Biological Macromolecules*. 104(Pt B):1548-1555. 2017.

PARK, Y., KIM, Y. J. ADAMS, M. E. 2002 Identification of G protein-coupled receptors for Drosophila PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 11423–11428.

PARRA, J. R. P. Biological control in Brazil: an overview. Scientia Agricola, Piracicaba, v. 71, n. 5, p. 345-355, 2014.

PATANKAR AG, GIRI AP, HARSULKAR AM, SAINANI MN, DESHPANDE VV et al. (2001) Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. Insect Biochemistry and Molecular Biology 31: 453-464.

PAUCHET, Y., WILKINSON, P., VOGEL, H., NELSON, D.R., REYNOLDS, S.E., HECKEL, D.G., FRENCH-CONSTANT, R.H., 2010. Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defence. Insect Mol. Biol. 19, 61e75.

PEARCE SL, CLARKE DF, EAST PD, ELFEKIH S, GORDON K, JERMIIN LS, et al. Genomic innovations, transcriptional plasticity and gene loss underlying the evolution and divergence of two highly polyphagous and invasive *Helicoverpa* pest species. BMC biology. 2017;15(1):63.

PECOT CV, CALIN GA, COLEMAN RL, LOPEZ-BERESTEIN G, SOOD AK. RNA interference in the clinic: challenges and future directions. Nat Rev Cancer. 2011 Jan;11(1):59-67.

PEDGLEY, D. E. Windborne migration of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to the British Isles. Entomologist's Gazette, Wallingford, v. 36, n. 1, p. 15-20, 1985.

PENG X, ZHA W, HE R, LU T, ZHU L, et al. (2011) Pyrosequencing the midgut transcriptome of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Insect Molecular Biology 20: 745–762.

PEREIRA JM, SEII AH, OLIVEIRA MF, BRUSTOLIN C, FERNANDES PM. 2009. Mortalidade de lagartas de *Spodoptera eridania* (Cramer) pela utilização de *Bacillus thuringiensis* (Berliner). Pesquisa Agropecuária Tropical 39: 140-143.

PEREZ-GUERRERO S, ALDEBIS HK, VARGAS-OSUNA H. 2012. Toxicity of six *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against the olive moth *Prays oleae*. Bulletin of Insectology 65: 119-122.

PEST ALERT. 2015. *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), the Old World Bollworm. Disponível em: <http://www.freshfromflorida.com/Divisions-Offices/Plant16Industry/Plant-Industry-Publications/Pest-Alerts/Pest-Alert-The-Old-World-Bollworm>. Consultado em 09-02-2018. PLoS One 7:1-9.

PETIT C, LE RU B, DUPAS S, FRÉROT B, AHUYA P, KAISER-ARNAULD L, et al. Influence of dietary experience on the induction of preference of adult moths and larvae for a new olfactory cue. PLoS ONE. 2015; 10(8):e0136169.

PINTO FA, MATTOS MV, SILVA FW, ROCHA SL, Elliot SL. The spread of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and coexistence with *Helicoverpa zea* in southeastern Brazil. Insects. 2017;8(3),87.

POGUE, M. G. A. New synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae). Annals of the Entomological Society of America, Lexington, v. 97, n. 6, p. 1222-1226, 2004.

PRATISSOLI, D.; LIMA, V. L. S.; PIROVANI, V. D.; LIMA, W. L. Occurrence of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on tomato in the Espírito Santo state. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 33, n. 1, p.101-105, 2015.

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

PRÜFER K, MUETZEL B, DO H-H, Weiss G, Khaitovich P, Rahm E, et al. FUNC: a package for detecting significant associations between gene sets and ontological annotations. BMC bioinformatics. 2007 ;8(1):41.

QUAN, G.X.; KANDA, T.; TAMURA, T.; 2002. Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm White gene. Insect Molecular Biology 11, 217–222.

QUEIROZ-SANTOS L, CASAGRANDE MM, SPECHT A. Morphological Characterization of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae). Neotropica Entomologica. 2018; 47: 517–542 <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0581-4>.

RADONIC, A.; THULKE, S.; MACKAY, I. M.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 313, n. 4, p. 856-862, 2004.

RAGLAND GJ, ALMSKAAR K, VERTACNIK KL, GOUGH HM, FEDER JL, HAHN DA et al. Differences in performance and transcriptome-wide gene expression associated with *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) larvae feeding in alternate host fruit environments. Molecular Ecology. 2015; 24, 2759–2776 doi: 10.1111/mec.13191.

RAJAGOPAL, R., SIVAKUMAR, S., AGRAWAL, N., MALHOTRA, P., BHATNAGAR, R.K., 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. Journal of Biological Chemistry 277, 46849–46851.

RAJAPAKSE CNK, WALTER GH, MOORE CJ, HULL CD, CRIBB BW. Host recognition by a polyphagous lepidopteran (*Helicoverpa armigera*): primary host plants, host produced volatiles and neurosensory stimulation. Physiol. Entomol. 2006; 31270-277.

RAZMJOU J, NASERI B, HEMATI AS. 2014. Comparative performance of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on various host plants. Journal of Pest Science 87: 29-37.

ROBERTSON, G., SCHEIN, J., CHIU, R., CORBETT, R., FIELD, M., JACKMAN, S. D., GRIFFITH, M. (2010). De novo assembly and analysis of RNA-seq data. Nature methods, 7(11), 909-912.

ROBINSON MD, MCCARTHY DJ, SMYTH GK. EDGER: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics. 2010; 26(1):139-40.

ROY, A.; WALKER, W. B.; VOGEL, H.; CHATTINGTON, S.; LARSSON, M. C.; ANDERSON, P.; HECKEL D. G.; SCHLYTER, F. Diet dependent metabolic responses in three generalist insect herbivores *Spodoptera* spp. Insect Biochemistry and Molecular Biology. v. 71, p. 91-105, 2016.

SAFURAIE-PARIZI S, FATHIPOUR Y, TALEBI AA. Evaluation of tomato cultivars to *Helicoverpa armigera* using two-sex life table parameters in laboratory. Journal of Asia-Pacific Entomology. 2014; 17, 837–844. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2014.08.004>.

SALVADORI, J. R.; SUZANA, C. S. Saldo da *Helicoverpa*. Cultivar Grandes Culturas, Pelotas, n. 187, p. 26-28, 2014.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nature Protocols, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SEAGRI, 2013. Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. Governo da Bahia e Mapa buscam estratégias para enfrentar a praga *Helicoverpa* no Oeste baiano. Available: http://www.seagri.ba.gov.br/not_Governo_da_Bahia_e_Mapas_estrategias_praga_Helicoverpa_032013.pdf (acesso em abril 2018).

- SEBASTIÃO I, LEMES ARN, FIGUEIREDO CS, POLANCZYK RA, DESIDÉRIO JA, LEMOS MVF. 2015. Toxicidade e capacidade de ligação de proteínas Cry1 a receptores intestinais de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Pesquisa Agropecuária Brasileira 50: 999-1005.
- SENAVE. Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas. Senave en alerta tras ingreso de peligrosa plaga agrícola. ABC Color, 2013. Disponível em: < <http://www.abc.com.py/edicion-impresa/economia/senave-en-alerta-tras-ingreso-depeligrosa-plaga-agricola-629240.html>>. Acesso em: 19 set. 2016.
- SIMÃO, F. A.; WATERHOUSE, R. M.; IOANNIDIS, P.; KRIVENTSEVA, E. V.; ZDOBNOV, E. M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics.; 31(19); 3210-3212, 2015.
- SONG, H.; ZHANG, J.; LI, D.; COOPER, A.M.; SILVER, K.; LI, T.; LIU, X.; MA, E.; ZHU, K.Y.; ZHANG, J. A double-stranded RNA degrading enzyme reduces the efficiency of oral RNA interference in migratory locust. Insect Biochem. Mol. Biol. 2017, 86, 68–80.
- SOSA-GÓMEZ, D. R.; SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S. V.; LOPES-LIMA, A.; YANO, S. A. C.; MICHELI, A.; MORAIS, E. G. F.; GALLO, P.; PEREIRA, P. R. V. S.; SALVADORI, J. R. BOTTON, M.; ZENKER, M. M.; AZEVEDO-FILHO, W. S. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo, v. 60, p. 101-104, 2016.
- SPARKS, M. E.; BLACKBURN, M. B.; KUCHAR, D.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E. Transcriptome of the *Lymantria dispar* (Gypsy Moth) Larval Midgut in Response to Infection by *Bacillus thuringiensis*. PLoS ONE 8(5): e61190, 2013.
- SPECHT A, SOSA-GOMEZ DR, PAULA-MORAES SV, YANO SAC. 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira 48: 689-692.
- SRINIVAS R, UDIKERI SS, JAYALAKSHMI SK, SREERAMULU, K. Identification of factors responsible for insecticide resistance in *Helicoverpa armigera*. Comparative Biochemistry and Physiology C – Toxicology & Pharmacology. 2004; 137, 261–269.
- SRIVASTAVA, C. P.; NITIN, J.; TRIVEDI, T. P. Forecasting of *Helicoverpa armigera* populations and impact of climate change. Indian Journal of Agricultural Sciences, New Delhi, v. 80, n. 1, p. 3-10, 2010.
- STAUBLI, F., T. J. D. JORGENSEN, G. CAZZAMALI, M. WILLIAMSON, C. LENZ et al., 2002 Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 3446–3451.
- STEPPUHN A, BALDWIN IT. Resistance management in a native plant: nicotine prevents herbivores from compensating for plant protease inhibitors. Ecol. Lett. 2007; 10, 499–511.
- STONE, J. V., MORDUE, W., BATLEY, K. E., AND MORRIS, H. R. (1976). Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilization during flight. Nature 263, 207–211.
- TABASHNIK, B.E.; Gassmann, A.J.; Crowder, D.W.; Carriere, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory, Nat. Biotechnol. 26 (2008) 199–202.
- TABASHNIK, B.E.; BREVAULT, T.; CARRIERE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres, Nat. Biotechnol. 31 (2013) 510–521.
- TANG, P. A. et al. Characterization of transcriptome in the Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) and gene expression analysis during developmental stages. Gene 622, 29–41 (2017).

TAO XY, XUE XY, HUANG YP, CHEN XY. Gossypol-enhanced P450 gene pool contributes to cotton bollworm tolerance to a pyrethroid insecticide. *Molecular Ecology*. 2012; 4371–4385.

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

TERENIUS O; PAPANICOLAOU A; GARBUTT JS; ELEFThERIANOS I; HUVENNE H; KANGINAKUDRU S; ALBRECHTSEN M; AN C; AYMERIC JL; BARTHEL A; BEBAS P; BITRA K; BRAVO A; CHEVALIER F; COLLINGE DP; CRAVA CM; DE MAAGD RA; DUVIC B; ERLANDSON M; FAYE I; FElföldI G; FUJIWARA H; FUTAHASHI R; GANDHE AS; GATEHOUSE HS; GATEHOUSE LN; GIEBULTOWICZ JM; GÓMEZ I; GRIMMELIKHUIJZEN CJ; GROOT AT; HAUSER F; HECKEL DG; HEGEDUS DD; HRYCAJ S; HUANG L; HULL JJ; IATROU K; IGA M; KANOST MR; KOTWICA J; LI C; LI J; LIU J; LUNDMARK M; MATSUMOTO S; MEYERING-VOS M; MILLICHAP PJ; MONTEIRO A; MRINAL N; NIIMI T; NOWARA D; OHNISHI A; OOSTRA V; OZAKI K; PAKONSTANTINO M; POPADIC A; RAJAM MV; SAENKO S; SIMPSON RM; SOBERÓN M; STRAND MR; TOMITA S; TOPRAK U; WANG P; WEE CW; WHYARD S; ZHANG W; NAGARAJU J; FFRENCH-CONSTANT RH; HERRERO S; GORDON K; SWEVERS L; SMAGGHE G. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J Insect Physiol*. 2011 Feb;57(2):231-45.

THANAVENTAN, G.; JEYARANI, S. Effect of different temperature regimes on the biology of *Bracon brevicornis* Wesmael (Braconidae: Hymenoptera) on different host larvae. *Journal of Biopesticides, Tamilnadu* v. 3, n. 2, p. 441-444, 2010.

THOMAZONI, D., SORIA, M. F., PEREIRA, E. J. G., DE GRANDE, P. E., 2013. *Helicoverpa armigera*: perigo iminente aos cultivos de algodão, soja e milho do estado de Mato Grosso. *Instituto Mato-Grossense do Algodão, Circular Técnica*, n.5, 12 p.

THOMING G, LARSSON MC, HANSSON BS, ANDERSON P. Comparison of plant preference hierarchies of male and female moths and the impact of larval rearing hosts. *Ecology*. 2013; 94, 1744–1752.

TIAN, H., PENG, H., YAO, Q., CHEN, H., XIE, Q., TANG, B., ZHANG, W., 2009. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS ONE* 4, e6225.

TODD AT, LIU E, POLVI SL, PAMMETT RT, PAGE JE. A functional genomics screen identifies diverse transcription factors that regulate alkaloid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal*. 2010; 62, 589–600. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04186.x.

TOMARI, Y., ZAMORE, P.D., 2005. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev*. 19, 517–529.

TORRES-VILA LM, RODRIGUEZ-MOLINA C, PLASENCIA AL, BIELZA-LINO P, RODRIGUEZ-DEL-RINCÓN A. 2002. Pyrethroid resistance of *Helicoverpa armigera* in Spain: current status and agroecological perspective. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 93: 55-65.

VAUTHIER, C., DUBERNET, C., CHAUVIERRE, C., BRIGGER, I., AND COUVREUR, P. (2003). Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly (alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J. Control. Release* 93, 151–160.

VERLINDEN H, VLEUGELS R, ZELS S, DILLEN S, LENAERTS C, CRABBE´ K, SPIT J, VANDEN BROECK J. 2014. Receptors for neuronal or endocrine signalling molecules as potential targets for the control of insect pests. *Advances in Insect Physiology* 46:167–303.

VOGEL, H., MUSSER, R. O. & CELORIO-MANCERA, M.-L. Transcriptome responses in herbivorous insects towards host plant and toxin feeding. *Annual plant reviews* 47, 197–233 (2014).

- VOJOU DI, S.; SABER, M.; GHAREKHANI, G.; ESFANDIARI, E. Toxicity and sublethal effects of hexaflumuron and indoxacarb on the biological and biochemical parameters of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Iran. *Crop Protection*, Amsterdam, v. 91, p. 100-107, 2016.
- WANG W; LI X; ZU Y (2005) Dynamic feature of flavonoids content in different organs of larch (*Larix gmelinii*). *Journal of Forestry Research* 16: 89–92.
- WANG Y, MA Y, ZHOU DS, GAO SX, ZHAO XC, TANG QB, et al. Higher plasticity in feeding preference of a generalist than a specialist: experiments with two closely related *Helicoverpa* species. *Scientific Reports*. 2017; 7:17876 doi:10.1038/s41598-017-18244-7.
- WANG, Z., GERSTEIN, M., & SNYDER, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 57-63.
- WANG, Z.; DONG, Y.; DESNEUX, N.; NIU, C. RNAi silencing of the HaHMG-CoA reductase gene inhibits oviposition in the *Helicoverpa armigera* cotton bollworm, *PLoS One* 8 (2013), e67732.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10: 57–63, 2009.
- WHYARD, S.; SINGH, A.D.; WONG, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39 (2009) 824–832.
- WINNEBECK, E. C.; MILLAR, C. D.; WARMAN, G. R. Why does insect RNA look degraded?. *Journal of Insect Science.*; 10(1).; 159, 2010.
- XIA, Q.; ZHOU, Z.; LU, C.; WONG, G, K-S.; YANG, H. A Draft Sequence for the Genome of the Domesticated Silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, Vol. 306, Issue 5703, pp. 1937-1940, 2004.
- XING, L.; YUAN, C.; WANG, M.; LIN, Z.; SHEN, B.; HU, Z.; ZOU, Z. Dynamics of the interaction between cotton bollworm *Helicoverpa armigera* and nucleopolyhedrovirus as revealed by integrated transcriptomic and proteomic analyses *Molecular & Cellular Proteomics*, 2017.
- XING, L.; YUAN, C.; WANG, M.; LIN, Z.; SHEN, B.; HU, Z.; ZOU, Z. Dynamics of the interaction between cotton bollworm *Helicoverpa armigera* and nucleopolyhedrovirus as revealed by integrated transcriptomic and proteomic analyses *Molecular & Cellular Proteomics*, 2017.
- XUE, X.-Y., MAO, Y.-B., TAO, X.-Y., HUANG, Y.-P., CHEN, X.-Y. New approaches to agricultural insect pest control based on RNA interference. *Adv. Insect Physiol.* 42, 73 (2012).
- YAMASAKI A, SHIMIZU K, EUJISAKI K. 2009. Effect of Host Plant Part on Larval Body-Color Polymorphism in *Helicoverpa Armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America* 102: 76-84.
- YUAN YY, LI M, FAN F, QIU XHJIS. Comparative transcriptomic analysis of larval and adult Malpighian tubules from the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. 2018;25(6):991-1005.
- ZDOBNOV EM, APWEILER R. InterProScan—an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics*. 2001; 17(9):847-8.
- ZHA, W.; PENG, X.; CHEN, R.; DU, B.; ZHU, L.; HE, G. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoSOne* 6:e20504, 2011.
- ZHANG J, WANG B, DONG S, CAO D, DONG J, WALKER WB, et al. Antennal transcriptome analysis and comparison of chemosensory gene families in two closely related noctuidae moths, *Helicoverpa armigera* and *H. assulta*. 2015;10(2):e0117054.

- ZHANG X., ZHANG J., ZHU, K.Y. (2010). Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Mol.Biol.* 19,683–693.
- ZHANG Y, XIUMIN F, WANG F, YANG Z. Spatial differences in (Z)-3-hexen-1-ol production preferentially reduces *Spodoptera litura* larva attack on the young leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Science.* 2016; 252, 367–373.
- ZHANG, J.; KHAN, S.A.; HASSE, C.; RUF, S.; HECKEL, D.G.; BOCK, R. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science* 2015, 347, 991–994.
- ZHANG, J.; KHAN, S.A.; HECKEL, D.G.; BOCK, R. Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection. *Trends Biotechnol.* 2017, 35, 871–882.
- ZHANG, S. Y.; XIE, B. Y.; CUI, J; LI, D. M. Biology of *Campoletis chloridae* (Uchida) (Hym., Ichneumonidae) developing in Bt-treated, Bt-resistant *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lep., Noctuidae) larvae. *Journal of Applied Entomology, Berlin*, v. 130, n. 5, p. 268-274, 2006.
- ZHAO S, FERNALD RD. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Comput Biol.* 2005; 12(8):1045-1062.
- ZHOU DS, VAN LOON JJA, WANG CZ. Experience-based behavioral and chemosensory changes in the generalist insect herbivore *Helicoverpa armigera* exposed to two deterrent plant chemicals. *J. Comp. Physiol. A.* 2010; 196, 791–799.
- ZHOU DS, WANG CZ, VAN LOON JJA. Chemosensory basis of behavioural plasticity in response to deterrent plant chemicals in the larva of the Small Cabbage White butterfly *Pieris rapae*. *J.Insect Physiol.* 2009; 55, 788–792.
- ZHU, J.Q.; LIU, S.; MA, Y.; ZHANG, J.Q.; QI, H.S.; WEI, Z.J.; YAO, Q.; ZHANG, W.Q.; LI, S. Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsRNA of an insect-associated gene *EcR*, *PLoS One* 7 (2012), e38572.