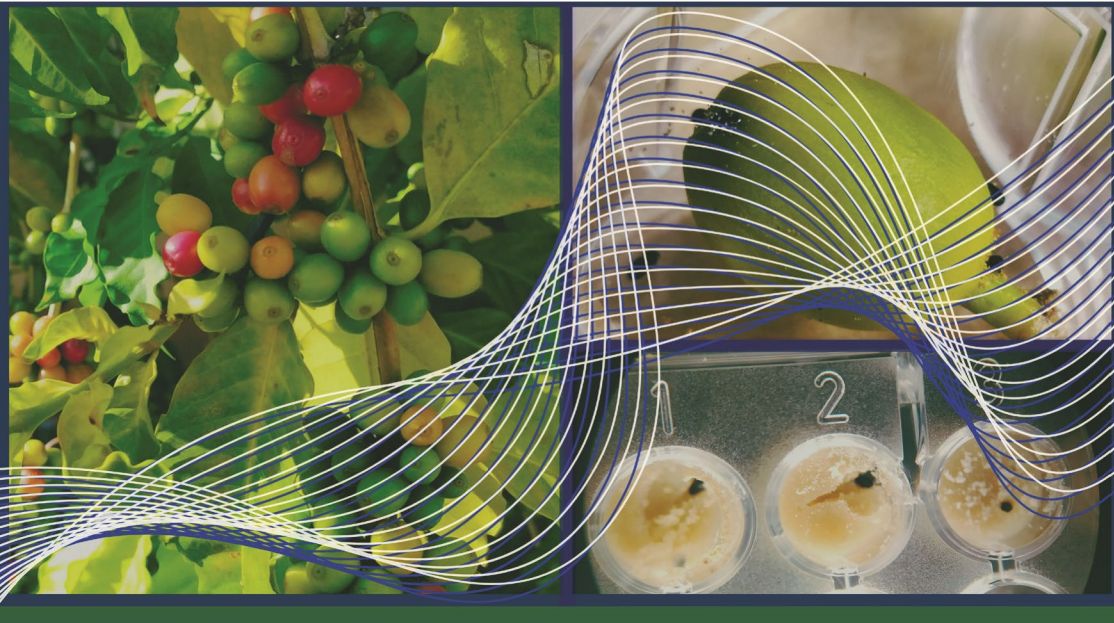


Brasília, DF / Maio, 2024

## Metodologia para a avaliação in vitro de dsRNAs para o controle biotecnológico da broca-do-café



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura e Pecuária***

e-ISSN 0101-0110

# ***Documentos 389***

Maio, 2024

## **Metodologia para a avaliação in vitro de dsRNAs para o controle biotecnológico da broca-do-café**

*Maria Cristina Mattar da Silva  
Lays Antunes Teixeira  
Mariana Santos Hildebrand  
Daniel David Noriega Vasquez  
Lukas Brayan de Andrade  
Leonardo Lima Pepino de Macedo  
Maria Fátima Grossi de Sá*

***Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Brasília, DF  
2024***

**Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia**

Endereço postal  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

*Priscila Grynberg*

Secretário-executivo

*Ana Flávia do Nascimento Dias*

Membros

*Andrielle Camara Amaral Lopes, Bruno*

*Machado Teles Walter, Débora Pires*

*Paula, Edson Junqueira Leite, Marcos*

*Aparecido Gimenes, Solange Carvalho*

*Barrios Roveri Jose*

Revisão de texto

*Maria Cristina Mattar*

Normalização bibliográfica

*Rosamares Rocha Galvão*  
(CRB-1/2122)

Projeto gráfico

*Leandro Sousa Fazio*

Diagramação

*Adilson Werneck*

Foto da capa

*Mariana Santos Hildebrand*

Publicação digital: PDF

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Nome-síntese da Unidade catalogadora

---

Metodologia para avaliação in vitro de dsRNAs para o controle biotecnológico  
da broca-do-café / Maria Cristina Mattar da Silva ... [et al.]. - Brasília, DF:  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2024.

PDF (55 p.) : il. color. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia,389 e-ISSN 0101-0110)

1. Café. 2. Praga. 3. Protocolo. I. Silva, Maria Cristina Mattar da. II. Série.

---

CDD (21. ed.) 634.98

*Rosamares Rocha Galvão* (CRB-1/2122)

© 2024 Embrapa

# Autores

---

## **Maria Cristina Mattar da Silva**

Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

## **Lays Antunes Teixeira**

Bióloga, mestranda em Ciências Genômicas e Proteômica, bolsista Concafé, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

## **Mariana Santos Hildebrand**

Bióloga, bolsista Concafé, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

## **Daniel David Noriega Vasquez**

Biólogo, doutor em Ciências Genômicas e Proteômica, pós doc Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

## **Lukas Brayan de Andrade**

Biólogo, bolsista Concafé, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

## **Leonardo Lima Pepino de Macedo**

Biólogo, doutor em Ciências Genômicas e Proteômica analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

## **Maria Fátima Grossi de Sá**

Bióloga, pós-doutorado em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF



Agradecemos,

Ao Consórcio de Pesquisa do Café que financiou a compra dos materiais e serviços utilizados na pesquisa, assim como pelas bolsas para a capacitação dos jovens profissionais que participaram deste estudo.

A Ana Maria Meneguim, pesquisadora do Iapar pela constituição da população da broca-docafé em dieta artificial.

Ao Adriano Veiga, pesquisador da Embrapa Cerrados pelo fornecimento de grãos de café verde para aplicação na elaboração da dieta artificial da broca-docafé.

Ao Luciano Paulino da Silva, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Bio-tecnologia pela realização das análises das formulações de partículas utilizando a técnica DSL.

Ao CNPq e a Capes pelas bolsas de mestrado e pós-doutoramento.



# Apresentação

---

O *Hypothenemus hampei*, conhecido como broca-do-café ou CBB (do inglês Coffee Berry Borer), é uma das principais pragas do cafeeiro. Desde que o inseticida endossulfan foi proibido por ser altamente tóxico, nenhum outro produto mostrou-se eficaz para controlar essa praga. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia desenvolveu uma metodologia para testar o efeito do silenciamento de genes específicos do CBB. Essa metodologia usa RNAi, nanotecnologia e aplicação tópica como estratégias de controle. O processo, descrito nesta publicação, inclui as seguintes etapas: seleção e amplificação de sequências nucleotídicas específicas do CBB; subclonagem dos fragmentos gênicos em vetores para a síntese in vitro dos dsRNAs; formulação de partículas para encapsular os dsRNAs; e avaliação do efeito do silenciamento dos genes alvo em bioensaios. Também são detalhadas as atividades para criar uma dieta artificial para os insetos e aplicá-la em bioensaios, usando alimentação oral ou aplicação tópica das partículas contendo os dsRNAs. Além disso, também apresenta sistema eficiente para pulverizar formulações de dsRNAs em insetos em laboratório. Nas considerações finais, discute-se o potencial dessa metodologia, que combina RNAi e nanotecnologia, para desenvolvimento de controle biotecnológico da broca-do-café por meio de aplicação tópica. Também vislumbra-se a possibilidade de adaptar essa técnica para controle em outras pragas agrícolas economicamente importantes.

*Marcelo Lopes da Silva*

Chefe-Geral

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia





# Sumário

<b>Introdução</b> .....	12
<b>Revisão bibliográfica</b> .....	15
Genética da broca-do-café .....	15
<i>Da variabilidade genética do Hypothenemus hampei</i> ..	15
Bancos de sequências: Genoma e Transcriptoma .....	16
Diferentes estratégias para aplicação de “ativos” moléculas promissoras para o controle biotecnológico da broca-do-café - Transformação genética de plantas via superexpressão de “moléculas inseticidas” .....	17
Transformação genética de plantas via RNA interferente: silenciamento de genes específicos por meio de moléculas de dsRNAs .....	18
Outras estratégias para aplicação dos ativos para o controle do inseto alvo .....	19
Criação do CBB em dieta artificial .....	20
<b>A Metodologia desenvolvida para a seleção e avaliação de genes com potencial para o controle do CBB</b> .....	23
Extração de DNA total (DNA genômico) .....	23
Extração de RNA total de alta qualidade .....	26
Seleção de genes alvo partindo do Transcritoma do CBB ....	28
Síntese de cDNA (DNA complementar) .....	29
Análise da expressão gênica por RT-qPCR (“Reverse Transcriptase Quantitative PCR”) .....	31
Síntese das moléculas de dsRNAs específicos .....	32
Amplificação dos fragmentos dos DNAs (específicos para o CBB).....	33

Reação de Transcrição in vitro da dupla fita de RNA: síntese do dsRNA .....	35
Bioensaios para avaliação dos dsRNAs alvo específicos.....	37
Entrega dos dsRNAs em dieta artificial para alimentação oral .....	38
Aplicação tópica (pulverização) de dsRNAs encapsulados em partículas .....	40
<b>Considerações finais</b> .....	42
<b>Referências</b> .....	44

## Introdução

---

O café, *Coffea arábica*, está presente na alimentação diária de grande parte da população global, evidenciando sua expressiva participação no mercado comercial. De acordo com a Organização Internacional do Café (OIC) (Organização Internacional do Café, 2021), em um ano, o consumo mundial de café foi estimado em torno de 166,62 milhões de sacas. O uso proeminente desta bebida movimenta a economia de países produtores, como a do Brasil, que possui o café em sétimo lugar na classificação de produtos da agropecuária com o maior valor bruto financeiro da produção (Brasil, 2021). Destaca-se que no ano de 2021, o café foi responsável por introduzir em torno de 42,6 bilhões de reais na economia brasileira, segundo dados da Secretaria de Política Agrícola (SPA) (Brasil, 2021), deixando claro que sua produção é de suma importância para o país.

O cultivo do cafeeiro envolve um procedimento delicado e trabalhoso (Mesquita et al., 2016), pois o manejo da planta depende de vários fatores atuando em conjunto para obter um produto de alta qualidade. É preciso ter muita atenção com ataque de insetos-praga e patógenos, uma vez que eles podem causar sérios danos aos grãos, comprometendo a sua qualidade e conseqüentemente, o seu valor comercial.

O inseto da ordem coleóptera *Hypothenemus hampei* nome-ado popularmente, broca-do-café (CBB da sigla em inglês *Coffee Berry Borer*) é a principal praga dos cultivos de café na atualidade, em praticamente todas as regiões produtoras. Originária da África Central, a broca-do-café alastrou de uma forma exponencial, atingindo todas as regiões com expressivos plantios de café, saindo da África à Ásia, América Central, América do Sul, Oriente Médio e assim, adiante (Waterhouse; Norris, 1989). O Brasil, que recebia a mercadoria da África e Indonésia, teve o seu primeiro contato com a praga por volta do ano de 1913 pelo estado de São Paulo, que logo se disseminou com facilidade pelo Brasil devido à alta umidade e temperatura ideal para a sua proliferação (Laurentino; Costa, 2004).

A nomenclatura popular deste inseto-praga resulta da forma que ele infecta os grãos, ao fazer um orifício quase imperceptível na parte inferior do grão, na região da coroa. A perfuração do grão é realizada pela fêmea, que apresenta cerdas e escamas filiformes capazes de infiltrar o endosperma do grão, formando galerias para ovipositar no interior da semente. Em seguida, os ovos eclodem para o segundo estágio, a larva, que se alimenta das substâncias presentes no fruto e então, evolui para pupa e chega finalmente na fase adulta (fêmeas e machos). As fêmeas já fertilizadas saem dos grãos e reiniciam o ciclo, por meio da infestação de um outro grão (Laurentino; Costa, 2004). A alimentação da broca-do-café é do tipo monófaga, restrita ao café. Porém, as fêmeas adultas atacam em todas as fases de desenvolvimento, incluindo o grão verde e o grão maduro (“tipo cereja”), podendo causar efeitos prejudiciais, devido à queda prematura dos grãos ou a proliferação de microrganismos oportunistas, que utilizam como porta de entrada os orifícios criados pelo inseto-praga (Constantino et al., 2011). Os lotes de café apresentando defeito, a cada cinco grãos brocados, são descartados resultando em grande prejuízo ao produtor (Souza, 2019).

A biologia e comportamento da broca-do-café são bastante estudados (Damon, 2000). Na morfologia da broca-do-café destaca-se a grande diferença de tamanho entre a fêmea e o macho, medindo em torno de 1,65 mm e 1,18 mm, respectivamente. A este dimorfismo entre os sexos, adiciona-se a proporção de ambos os indivíduos na natureza, sendo encontrado, em média, um indivíduo macho para cada dez fêmeas, esclarecendo a relação endogâmica que eles mantêm no ciclo de vida (Damon, 2000). Este ciclo varia de acordo às condições climáticas, como umidade e temperatura (Portilla; Streeett, 2022), mas o seu padrão permanece por um período aproximado de 28 dias entre as fases de ovo e pupa. A longevidade dos adultos varia entre 40 dias para o macho, podendo as fêmeas chegar a 156 dias de vida (Constantini et al., 2011).

O manejo desta praga é árduo e ainda ineficiente, dificultado principalmente pelo ciclo endofítico de desenvolvimento do inseto dentro dos grãos de café. Atualmente, o manejo vem

sendo realizado por meio de monitoramento (catação manual), armadilhas e pesticidas (Souza et al., 2020). No passado, o endosulfan foi o agrotóxico mais utilizado para o controle da broca-do-café. Porém, durante a quinta Conferência das Partes (COP 5) realizada em 2013 em Estocolmo, com o apoio de outros países, o uso do endosulfan foi banido da agricultura brasileira (Avila, 2011) e desde então, não apareceu um outro químico com as mesmas características para o manejo. Na última década, cresceu o número de práticas menos prejudiciais ao ambiente, como o uso de inimigos naturais ao *H. hampei*. O destaque dessa estratégia é a *Beauveria bassiana*, um fungo capaz de infectar insetos-praga e minimizar sua propagação (Damon, 2000). No entanto, embora a aplicação do fungo seja cada vez mais comum, esta prática não supera os manejos tradicionais, como o monitoramento em “zigue-zague”, que coordena uma faixa menor de observação intensiva com o objetivo de otimizar o tempo aplicado a esse processo. Em adição, armadilhas com atrativos, que utilizam feromônios ou alimentos com substâncias mortíferas ao inseto, é habitual para vigilância e contenção da broca-do-café (Souza et al., 2020). No entanto, permanece uma lacuna extensa para se alcançar a contenção da propagação do inseto com uma alta eficácia. Tal cenário demanda a continuidade dos estudos e o desenvolvimento de novas estratégias e tecnologias para auxiliar no controle da broca-do-café. Soluções alternativas, com potencial para o controle, envolvem conhecimentos da genética do CBB associado às técnicas de biotecnologia, para geração de plantas transgênicas resistentes ao inseto-praga. Ainda, destaca-se o emprego da nanotecnologia no desenvolvimento de formulações contendo os fragmentos gênicos alvo específicos, ou seja, os dsRNAs, encapsulados em partículas. Esta estratégia pode resultar em produtos como bioinseticidas, capazes de reduzir a população de CBB, após a aplicação tópica.

No presente trabalho, apresentamos as etapas de uma metodologia desenvolvida para selecionar e avaliar dsRNAs de genes alvo específicos, com potencial para uso em uma solução biotecnológica para auxiliar no controle do CBB. O desenvolvimento de um sistema para simular a aplicação tópica sobre o

CBB em laboratório, por meio de pulverização de soluções com partículas de dsRNA é também apresentado para a viabilização dos experimentos de bioensaios.

## Revisão bibliográfica

### Genética da broca-do-café

#### *Da variabilidade genética do *Hypothenemus hampei**

O inseto alvo deste estudo possui um sistema genético anômalo, uma vez que a espécie é funcionalmente haplodiploide (Brun et al., 1995). Enquanto as fêmeas adultas, funcionalmente diploides, expressam e transmitem cromossomos derivados de ambos os genitores, os machos, funcionalmente haploides, expressam e transmitem apenas cromossomos maternos, sendo os cromossomos paternalmente herdados silenciados devido à heterocromatização (Navarro-Escalante et al., 2021). Por outro lado, a exemplo do que ocorre em alguns insetos, além do CBB, não existe diferença aparente no cariótipo de fêmeas e machos do CBB. Vega et al. (2002), mostraram que a Wolbachia, uma proteobactéria intracelular herdada maternalmente, pode ter uma significativa função na biologia do CBB e ser responsável pelos efeitos da proporção sexual desigual, favorecendo as fêmeas. É conhecido que este endossimbionte causa incompatibilidade citoplasmática unidirecional ou bidirecional, em que a fertilidade dependerá da cepa de Wolbachia (O’Neill et al., 1997; Bourtzis; O’Neill, 1998). Outros eventos associados a Wolbachia seriam: presença de partenogênese, identificado em *H. hampei* (Barrera et al., 1995) e a morte prematura dos machos, relatada para vários insetos, durante ambos os estágios, inicial e tardio do ciclo de desenvolvimento (Hurst et al., 1997, Fialho; Stevens, 2000, Hurst et al., 2000, Jiggins et al., 2000). Contudo, o mecanismo de controle da eliminação/ativação do genoma paterno (PGE) e nem a determinação do sexo, está totalmente elucidado no caso do coleóptera da broca-do-café.

## Bancos de sequências: Genoma e Transcriptoma

Os dados públicos de sequências genômicas e transcritômicas do *H. hampei* se resumem a:

1) Genoma “parcial” partindo de fêmeas adultas (Vega et al., 2015) contendo 163 Mb e 19.222 genes codificando para proteínas preditas. As análises destes dados foram focadas em genes envolvidos na digestão e detoxificação de moléculas de defesa de plantas e inseticidas;

2) Transcriptoma partindo de sequências de RNA de larvas, fêmeas e machos do CBB (Noriega et al., 2019). Após a montagem *de novo* e anotação funcional dos transcritos, foram identificados 29.434 unigenes, dos quais 4.664 foram diferencialmente expressos. Os resultados obtidos neste estudo ajudaram a elucidar os papéis críticos que vários genes desempenham como elementos reguladores no desenvolvimento da CBB, como por exemplo, elementos móveis como determinantes da diferenciação sexual, genes de reconhecimento sensorial e proteínas digestivas.

3) Navarro-Escalante (2021) sequenciaram e montaram uma nova versão do genoma do CBB partindo de adultos machos e fêmeas. Visando entender as diferenças entre ambos os sexos, as análises a partir dos bancos de dados foram focadas em genes de percepção sensorial e permitiu identificar grandes regiões gênicas (“scaffolds”), associadas ao dimorfismo sexual. O conhecimento resultante destas análises contribuiu para melhorar o entendimento de como ocorre a determinação do sexo no CBB.



## Diferentes estratégias para aplicação de “ativos” moléculas promissoras para o controle biotecnológico da broca-do-café - Transformação genética de plantas via superexpressão de “moléculas inseticidas”

A estratégia aplicando técnicas de engenharia genética e de transformação de plantas, utilizando genes de diferentes classes e mecanismos de ação, validados in vitro, representa uma solução alternativa, para o controle de insetos-praga de impacto para a agricultura. Exemplificando, em López-Pazos et al. (2009), os autores mostraram a atividade biológica das toxinas Cry1Ba e Cry3Aa de *Bacillus thuringiensis* (Bt) contra larvas do primeiro instar do CBB e associaram a dependência de um efeito tóxico, às condições fisiológicas presentes no intestino do inseto. Plantas transgênicas de café expressando a proteína Cry1aC para resistência ao lepidóptero bicho mineiro (*Leucopetera coffeella*) foram desenvolvidas por Leroy et al. (2000). No entanto, nos experimentos para análise das plantas GM em campo, o resultado de produtividade foi considerado insatisfatório (Perthuis et al., 2015). Embora existam várias toxinas Cry indicadas para toxicidade em lagartas (lepidópteros), poucas Cry são sugeridas para ação contra espécies de coleópteros. No entanto, Mendez-López et al. (2003) mostraram que o *B. thuringiensis serovar israelensis* (Bti), que contém a proteína Cry10Aa apresenta alta toxicidade contra o CBB. Posteriormente, a atividade específica de Cry10Aa in vitro e, em seguida, a sua expressão em plantas de algodão foi publicada para o coleóptero, bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) (Aguiar et al., 2012; Ribeiro et al., 2017, respectivamente). Aplicando um protocolo desenvolvido para a transformação genética de plantas de café, Barbosa et al. (2010) obtiveram plantas expressando o gene para inibidor de alfa-amilase ( $\alpha$ AI-1), isolado de *Phaseolus vulgaris*. Embora os grãos de café das plantas transgênicas (geração T2) tenham mostrado nível satisfatório de expressão, o efeito da presença do inibidor da enzima digestiva não foi limitante para o desenvolvimento do inseto, apenas gerou o retardamento de algumas fases. Assim, as análises a respeito do efeito do inibidor  $\alpha$ AI-1 sobre a enzima do intestino do

inseto CBB, alimentado in vitro, não foram consideradas conclusivas (Albuquerque et al., 2015). Posteriormente, Valencia-Lozano et al. (2019) publicaram a transformação estável de plantas de café expressando alta taxa da proteína Cry10Aa (7,6 a 13,88 µg/g de tecido fresco de folhas e embriões) e discutiram perspectivas promissoras para o controle do CBB, após o avanço das progênes e a realização de experimentos em campo.

### **Transformação genética de plantas via RNA interferente: silenciamento de genes específicos por meio de moléculas de dsRNAs**

O processo de silenciamento gênico mais estudado para aplicação no controle de pragas agrícolas é conhecido como silenciamento gênico pós-transcricional, mediado por RNA dupla fita (dsRNA, da sigla em inglês “double stranded RNA”) (Price; Gatehouse, 2008). Por meio deste mecanismo, moléculas longas (de 200 a 1.000 bp) de dsRNAs complementares a fragmentos específicos de RNA mensageiro (mRNA) podem ser aplicadas de forma exógena no inseto alvo. Após internalização das moléculas de dsRNAs nas células, uma maquinaria de processamento, formada principalmente por ribonucleases, denominadas proteínas Dicer, cliva as moléculas longas de dsRNAs em pequenos fragmentos conhecidos como pequenos RNAs interferentes (siRNA, em inglês “Small interfering RNA”). Estes pequenos fragmentos agem como guias, se ligando ao mRNA complementar, para que um complexo enzimático denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*) quebre o mRNA, levando à degradação do mesmo e a consequente redução na expressão da proteína alvo codificada (Hammond et al., 2001<sup>1</sup>, citado em Noriega; Vasquéz, 2022; Darlington et al., 2022).

No geral, os estudos com plantas transgênicas expressando moléculas de dsRNAs (RNA de fita dupla) indicando potencial para conferir resistência a diversas pragas (Baum et al., 2007,

---

<sup>1</sup>HAMMOND, S. M.; CAUDY, A. A.; HANNON, G. J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews Genetics*, v. 2, n. 2, p. 110-119, 2001.

Mao et al., 2011, Mao et al., 2015, Coleman et al., 2015, Hussain et al., 2019, Arya et al., 2021) entre outros, tem aumentado de forma relevante. Por outro lado, ainda é pouco expressivo o número de eventos transgênicos obtidos com aplicação da tecnologia de RNAi e, atualmente, liberados para a comercialização (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, 2023). A principal razão para o pouco avanço rumo a comercialização de eventos RNAi é a identificação dos elementos envolvidos para a redução da expressão gênica, os quais podem variar entre ordens e até mesmo, entre espécies (Cooper et al., 2020; Kunte et al., 2020). Em insetos, os principais fatores que afetam a eficiência da tecnologia de RNAi são: a instabilidade do dsRNA no ambiente extracelular (Shukla et al., 2016; Cao et al., 2018; Song et al., 2019), absorção do dsRNA ineficiente a nível celular (Shukla et al., 2016, Vélez; Fishilevich, 2018) e diferenças na maquinaria enzimática de RNAi entre espécies (R. Guan et al., 2018; You et al., 2020; Arraes et al., 2021).

## **Outras estratégias para aplicação dos ativos para o controle do inseto alvo**

Além da expressão em plantas transgênicas, as proteínas Cry com potencial para o controle dos insetos alvo, também podem ser produzidas e aplicadas em estratégias para aplicação tópica, como pulverização de bioinseticidas a base de proteínas Cry (NPIC, 2023) e formulações contendo dsRNAs para silenciar genes específicos (Guan et al., 2021; Lucena-Leandro et al., 2022; Guan et al., 2023).

Para o caso de aplicação de dsRNAs específicos, métodos para melhorar a sua eficiência tem como objetivo proteger as moléculas da degradação por enzimas nucleases do inseto e manter a sua estabilidade no interior das células (plantas e ou insetos) (Ribeiro et al., 2022) ou mesmo, na superfície das plantas quando da aplicação tópica. Neste contexto, diferentes tipos de entrega das moléculas de dsRNAs aos insetos incluem: depósito/absorção na dieta (alimentação) e ou a aplicação tópica (contato) (Santos-Ortega; Flint, 2022). Esta última, objetivando atingir superfícies da planta, preferidas pelos insetos para o seu ataque. No caso específico do cafeeiro, o ideal seria manter o

produto ativo estável na superfície dos frutos por algum tempo. Desta maneira, as fêmeas fertilizadas do CBB, ao saírem dos grãos para ovipositar outros grãos, teriam contato com o produto, alimentando-se e ou internalizando-o por meio de contato com a cutícula (presente na carcaça do inseto).

Uma solução promissora de entrega eficiente do dsRNA específico ao alvo, envolve técnicas de nanotecnologia para encapsulamento dos nucleotídeos, resultando em partículas potencialmente estáveis (Petrônio et al., 2022). A utilização de nanomateriais (quitosana, PEI, etc.) como carreadores, pode auxiliar para que o ativo atinja o alvo em segurança e, desta forma, auxiliar no manejo de insetos-praga, inclusive daqueles que possuem o hábito endófito de desenvolvimento, como é o caso da broca-do-café.

No presente trabalho, a partir do transcrito do CBB (Noriega et al., 2019), apresenta-se a Metodologia desenvolvida para avaliar fragmentos gênicos de fita dupla (dsRNAs) promissores para aplicação no desenvolvimento de um controle biotecnológico para insetos-praga, com foco no CBB. A estratégia metodológica envolve protocolos específicos, desenvolvidos e validados para o caso do CBB, incluindo as seguintes etapas: 1) seleção de sequências de nucleotídeos, específicas do CBB para aplicação na tecnologia de RNAi; 2) Extração de DNA e RNA de alta qualidade; 3) síntese *in vitro* e dsRNAs específicos para o CBB; 4) análises *in vitro* (bioensaios) para a avaliação do efeito dos dsRNAs no desenvolvimento e metabolismo do CBB.

## **Criação do CBB em dieta artificial**

A criação e manutenção de uma população geneticamente homogênea da broca-do-café em dieta artificial é um requisito essencial para a aplicação da metodologia aqui apresentada, de modo a viabilizar o processo, desde a etapa inicial de obtenção das amostras de DNA e RNA com alta qualidade, para a realização de sequenciamento e obtenção do banco de dados de sequências, à etapa final de validação dos alvos, em bioensaios na presença dos insetos.

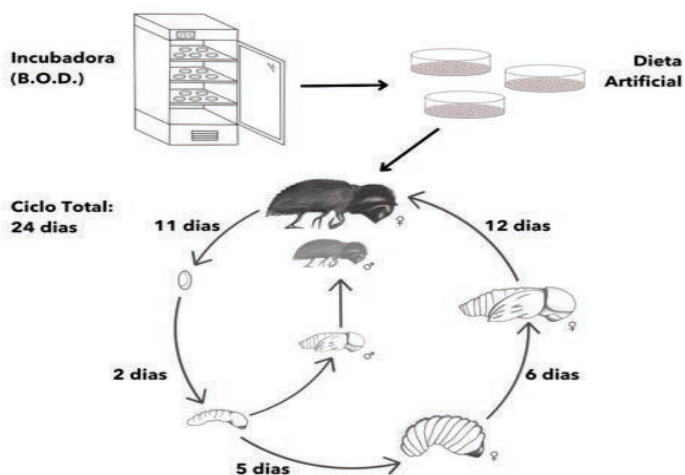
A composição da dieta artificial do CBB é altamente específica. Desde a dieta meridica, desenvolvida por Villacorta (Villacorta, 1985), outros métodos foram publicados, porém os detalhes de fabricação não são descritos (Villacorta; Barrera, 1993; Brum et al., 1993; Portilla; Streett, 2006; Ferreira, 2022). Além dos componentes específicos da dieta (pó de café, ágar, reagentes inibidores de contaminação, vitaminas, entre outros), o êxito para a criação de *H. hampei* está principalmente, no controle das condições de umidade, temperatura e fotoperíodo em cada processo (Portilla; Street, 2022; Wei et al., 2023).

Para este trabalho, a primeira geração de insetos em dieta artificial partiu de frutos de café (*Coffea arabica*, cultivar Iapar 59) infestados com o CBB, coletados em cafezais no estado do Paraná, Brasil, e encaminhados para o tratamento em laboratório. Após atingirem aproximadamente 24% de umidade, os grãos foram distribuídos em estruturas de criação e de coleta de adultos. Os adultos obtidos foram inoculados em dieta artificial (Villacorta; Barrera, 1993) e mantidos em câmara climatizada ( $25 \pm 2$  °C, UR  $60 \pm 10$  % e ausência de luz). O procedimento inicial foi realizado no laboratório de entomologia do Iapar (atualmente, Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná), durante os meses de maio a setembro, totalizando o preparo de 1.206 placas (9,0 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) com dieta e a infestação destas com 60.600 adultos. Após várias gerações, a população de insetos em dieta artificial foi transferida para o laboratório de bioensaios da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, onde se continua o manejo para manutenção da população.

O ciclo de vida da broca-do-café (do ovo ao adulto) utilizando a dieta artificial e as condições ambientes estabelecidas no laboratório da Embrapa totaliza aproximadamente 24 dias (Figura 1), sendo similar ao citado na literatura científica para os estudos aplicando diferentes formulações de dieta artificial (Portilla, 1999; Ferreira et al., 2022).

A transferência periódica (a cada 3 meses) de fêmeas e de machos ativos (100 fêmeas para 10 machos) para uma dieta

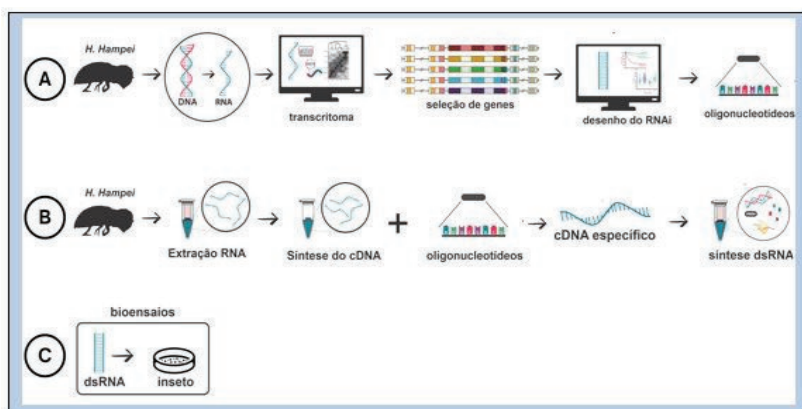
fresca, contida em placa de Petri de vidro (9,0 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) e armazenada em incubadora com condições controladas (BOD) (Figura 1), garante a manutenção da população do CBB. Nas condições estabelecidas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, as fêmeas sobrevivem na dieta, por aproximadamente 180 dias.



**Figura 1** – Esquema ilustrativo com as fases e períodos do ciclo de vida do CBB, na criação em dieta artificial localizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os ovos começam a surgir a partir de 11 dias, após a oposição das fêmeas fertilizadas (de coloração marrom escuro). O intervalo observado entre a eclosão dos ovos e surgimento de larvas L1 é, em média, de dois dias. O desenvolvimento de estágio L1 para L2 leva aproximadamente 5 dias no caso de fêmeas. Os machos não passam pelo estágio L2. O intervalo entre L2 e o estágio de pupa é de 6 dias e o intervalo registrado entre a pupa e a fêmea adulta é de 12 dias.

## A Metodologia desenvolvida para a seleção e avaliação de genes com potencial para o controle do CBB

A metodologia desenvolvida, visando o controle biotecnológico do inseto-praga *H. hampei*, envolveu várias etapas consecutivas, indicadas no infográfico abaixo (Figura 2) e detalhada no texto abaixo.



**Figura 2.** Fluxograma ilustrando as etapas da Metodologia desenvolvida para a avaliação de fragmentos de genes, promissores para uso no controle biotecnológico do CBB. As etapas, partindo do transcriptoma do *Hypothenemus hampei* incluem: seleção de sequências de nucleotídeos específicos para aplicação na tecnologia de RNAi (A); extração do RNA com alto grau de pureza, utilizado na obtenção do cDNA, usado como molde para a amplificação do fragmento alvo específico. O produto com cDNA específico é aplicado na síntese in vitro das moléculas de dsRNAs (B) e bioensaios para a avaliação do efeito dos dsRNAs (C).

### Extração de DNA total (DNA genômico)

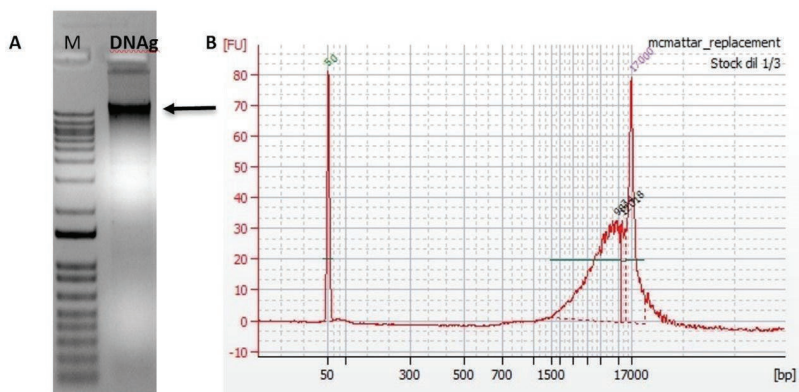
O material biológico para a extração de DNA genômico (DNAg ou DNA total) é coletado da criação da broca-do-café em dieta artificial. Cada amostra constituída por larvas, pupas ou

adultos, são colocadas em microtubos (1,5 mL), totalizando o equivalente a 50 µg (no caso de fêmeas adultas esta massa equivale a aproximadamente 30 indivíduos). As amostras podem ser congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente submetidos à extração do DNA ou então, armazenadas em -80 °C, para uso posterior. Uma vez que, não existe um kit comercial específico para a extração de DNA de insetos coleópteros, testou-se, alguns kits comerciais, realizando adaptações aos protocolos dos fabricantes. A melhor amostra de DNA de CBB foi obtida com o Kit DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) aplicando o protocolo “Purification of Total DNA from Animal Tissues - Spin Column”, fornecido pelo fabricante, seguido do tratamento para a eliminação de RNA residual, aplicando-se a enzima RNase A tipo III (Sigma, Mannheim, Germany) (10 µg/µL). A reação é incubada a 37 °C, por 16 h.

A quantificação e avaliação da integridade das amostras de DNA genômico podem ser realizadas em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídeo. A quantificação é realizada pela análise visual e comparativa com o perfil eletroforético do marcador de massa molecular High DNA Mass Ladder (Invitrogen, Ontario, Canadá). Um DNA total de inseto, é estimado como íntegro e de alta qualidade quando não apresenta sinais de degradação ou presença de RNA, após a análise por eletroforese. Para maior precisão da análise de qualidade do DNA genômico utilizar o sistema Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, Estados Unidos), que é capaz de detectar a presença de fragmentos de DNA de tamanho mínimo (não visualizado no gel de agarose). As alíquotas de DNA genômico preparadas e analisadas como descrito acima podem ser armazenadas a -80 °C, por tempo indeterminado.



Amostras de DNA genômico íntegro e contendo alto grau de pureza é pré-requisito para a realização do sequenciamento por PacBio, resultante em grande quantidade de sequências nucleotídicas, possibilitando a obtenção de um banco de dados robusto, representando o genoma da espécie. A Figura 3 (A) exemplifica o perfil de separação obtido após eletroforese em gel de agarose indicando uma amostra de DNAg com alto grau de pureza e sem vestígios de degradação. Em paralelo, a análise utilizando o sistema Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, Estados Unidos), graficamente ilustrada na Figura 3 (B) sugere que a maior parte do DNA possui em torno de 15.000 pares de bases (pb), caracterizando um DNA íntegro e de alto peso molecular.



**Figura 3.** Análise da qualidade do DNA genômico extraído a partir de fêmeas do CBB. Eletroforese utilizando gel de agarose. Marcador de massa molecular 1kb ladder – (Invitrogen, Ontario, Canada) (M). A seta indica a porção majoritária da amostra DNAg, com aproximadamente 15.000 bp (A). Gráfico do DNAg analisado no sistema Bioanalyzer, indicando maior parte do DNAg com tamanho entre 15.000 a 17.000 pb (B).

## Extração de RNA total de alta qualidade

A obtenção de amostras de RNA total de alta qualidade representa um desafio para os estudos com a broca-do-café. De modo geral, a preparação do RNA total exige maior cuidado em comparação à extração do DNA. Isto deve-se à instabilidade da molécula (fita simples) e a presença de endonucleases, como as RNases, que são responsáveis pela degradação da mesma (Winnebeck et al., 2010).

As melhores amostras de RNA total, partindo de cada fase do ciclo de vida da broca-do-café, obteve-se utilizando os reagentes do RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). O protocolo descrito abaixo, inclui as adaptações realizadas ao protocolo fornecido pelo fabricante:

- a. Armazenar pelo menos 30 fêmeas adultas, coletadas da criação da broca-do-café colocadas, em tubos de microcentrífuga (1,5 mL) e imediatamente, congelar em nitrogênio líquido. Cada amostra consiste em aproximadamente 30 fêmeas/tubo (50 µg), recomendada como quantidade mínima para se obter um rendimento satisfatório do RNA;
- b. Macerar os insetos até a obtenção de um pó fino, com auxílio de um pequeno pistilo de plástico, utilizando nitrogênio líquido para manter a amostra congelada, mas evitando o contato direto com o material;
- c. Aplicar em cada amostra 404 µL da mistura contendo 400 µL de tampão RLT e 4 µL de 2- beta- mercaptoetanol (Gibco, Ontario, Canadá) e incubar imediatamente no gelo;
- d. Após centrifugação (13.000 rpm, 3 min, 4°C), transferir o sobrenadante para um novo tubo;
- e. Adicionar um volume de Etanol 70% gelado (-20 °C), misturando por meio de pipetagem, cuidadosamente.

- f. Aplicar o material na coluna de purificação (fornecida no kit) e centrifugar (8.500 rpm, por 15 segundos). Devido a capacidade máxima da coluna (700  $\mu$ L), esta etapa pode ser repetida várias vezes, até a aplicação de todo o material.
- g. Após cada centrifugação, o material eluído da coluna é descartado. Ao material aderido na resina da coluna (cor rosa) depositar 700  $\mu$ L do tampão RW1 e centrifugar a 8.500 rpm, por 15 segundos. Descartar o material eluído.
- h. Adicionar na coluna 500  $\mu$ L do tampão RPE, centrifugar 8.500 rpm, 15 segundos e descartar o eluído.
- i. Adicionar 700  $\mu$ L do tampão RPE e centrifugar a 8.500 rpm, por 2 min.
- j. Repetir a centrifugação com a coluna “vazia” a 8.500 rpm por 1 min para eliminar etanol residual.
- l. Transferir a coluna para um novo microtubo (1,5mL), adicionar 25  $\mu$ L de água (RNAse *free* - 37 °C) no centro da resina, incubar por 5 minutos em temperatura ambiente e centrifugar a 8500 rpm, 1 min.
- m. Manter as amostras (RNA total) no gelo, até determinar a sua concentração em espectrofotômetro no Nanodrop Eppendorf, AG, Germany) ou similar. Em seguida, analisar a integridade do RNA, após eletroforese em gel de agarose 0.8%.
- n. As amostras com alta qualidade (concentração alta e ausência de sinais de degradação) devem ser armazenadas a -80 °C, para uso posterior, nas etapas de preparação dos cDNAs para análises de expressão gênica e ou síntese dos dsRNAs.

A foto da Figura 4, ilustra uma análise de integridade para as amostras de RNA total extraído de fêmeas do CBB, utilizando eletroforese em gel de agarose 1%. O perfil eletroforético de um RNA total íntegro deve apresentar apenas duas bandas (correspondendo aos RNAs ribossômicos 28S e 18S) e, em alguns casos, a banda equivalente ao 5S (Winnebeck, et al., 2010).

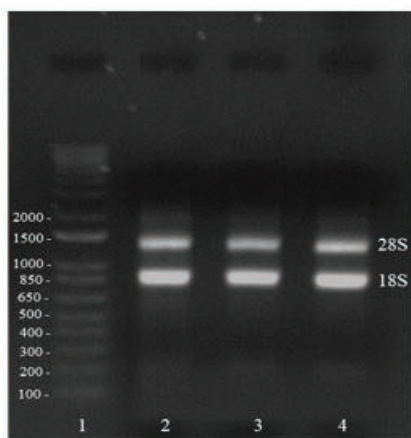


Foto: Lays A. Teixeira.

**Figura 4.** Resultado da eletroforese de três amostras aleatórias de RNA total, obtidas a partir de fêmeas adultas do CBB. Marcador de massa (1Kb ladder plus (Invitrogen, Ontario, Canada) **coluna (1)**). Perfil eletroforético de três amostras (aleatórias) de RNA total, mostrando a presença as bandas íntegras equivalentes as subunidades 28S e 18S referente às unidades ribos-somais, **colunas (2), (3) e (4)**.

## **Seleção de genes alvo partindo do Transcritoma do CBB**

Cinco diferentes genes alvo (denominados aqui de *G1*, *G2*, *G3*, *G4* e *G5*) selecionados para serem aplicados na tecnologia de RNAi e avaliados quanto ao efeito sobre o controle do CBB são originados do banco de transcritos do CBB. As “iscas” para a identificação, no banco de dados, das sequências gênicas

alvo é escolhida com base em resultados da literatura, validados para outros coleópteros, como *Anthonomus grandis* (Firmino et al., 2013) e *Diabrotica virgifera* (Flagel et al., 2014). As sequências dos genes alvos, obtidas a partir do transcrito do CBB (Noriega et al., 2019), alocado na Plataforma de Bioinformática da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF e parcialmente, depositado no banco de genes do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) com o N. SUB4491034, não são divulgadas neste trabalho divulgadas devido à proteção intelectual. As categorias funcionais destas sequências são relacionadas à metamorfose e ao metabolismo do inseto.

Para gerar os alinhamentos das sequências alvo para o CBB com as sequências de outros insetos-praga (coleópteros) utilizou-se o programa ClustalW<sup>2</sup>. A partir dos alinhamentos, são escolhidas as regiões não conservadas entre os insetos, determinadas como sequências específicas para o CBB. As sequências alvo específicas, são aplicadas nas etapas subsequentes da presente metodologia, visando produzir o silenciamento gênico, altamente específico para o CBB, via RNAi interferente.

## Síntese de cDNA (DNA complementar)

A enzima transcriptase reversa, também chamada de DNA polimerase-dependente de RNA, é encontrada em retrovírus e age na transcrição reversa (sentido RNA para DNA). Pela ação da transcriptase reversa é possível a síntese de fitas de DNA complementar (cDNA), a partir de RNA. Esta ação possibilita a sua aplicação também em estudos de expressão gênica, como na técnica de RT-PCR (“Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction”) para o estudo da expressão dos genes.

---

<sup>2</sup> Disponível em: <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>

Partindo do RNA total das fêmeas do CBB (descrito acima), a síntese do cDNA pode ser obtida pela aplicação do seguinte protocolo:

a. Para cada amostra, partir de 2.000 ng de RNA total, como molde. Se necessário, diluir o RNA original com água para o volume final de 8  $\mu\text{L}$ .

b. Utilizar e programar o termociclador de modo que todas as incubações/reações para a síntese dos cDNAs ocorram sequencialmente, sem perda de tempo: 37 °C por 30 min; 65 °C por 5 min; 37 °C por 2 min; 37 °C por 50 min; 70 °C por 15 min; - 4 °C por tempo indeterminado.

c. Adicionar aos 2.000 ng de RNA, 2  $\mu\text{L}$  do MIX 1 (1  $\mu\text{L}$  da enzima TURBO™ DNase 2U/ $\mu\text{L}$  (Invitrogen, Ontario, Canada) + 1  $\mu\text{L}$  do tampão da DNase 10X) e incubar a 37 °C (no termociclador) por 30 min.

d. Pausar a incubação com o MIX 1, 10 segundos antes do término de incubação a 37 °C, e aplicar 2  $\mu\text{L}$  do MIX 2 (1 $\mu\text{L}$  do dNTP 10 mM (Invitrogen, Ontario, Canada) + 1 $\mu\text{L}$  do Oligo dT Primer 10  $\mu\text{M}$  (Invitrogen, Ontario, Canada)). Incubar a 65 °C, por 5min.

e. Aos dez segundos antes de finalizar a incubação do MIX 2 (65 °C), transferir as amostras para uma estante e, imediatamente, resfriar em balde com gelo, por 5 min. Não permitir o contato direto das amostras com o gelo.

f. Preparar o MIX 3 com os reagentes fornecidos pelo kit de transcrição reversa – M-MLV (Invitrogen, Ontario, Canadá) (4  $\mu\text{L}$  do tampão 5X + 2  $\mu\text{L}$  do DTT). Adicionar 2  $\mu\text{L}$  em cada amostra. Incubar imediatamente (no termociclador) a 37 °C, por 2 min.

g. Interromper a programação do termociclador dez segundos antes do término da incubação a 37 °C, aplicar 1  $\mu\text{L}$  da enzima M-MLV em cada amostra e seguir com a programação, completando a incubação de 50 min a 37 °C, seguido de 70 °C por 15 min e finalmente, 4 °C.

h. Armazenar as amostras de cDNAs a -20 °C para uso posterior.

## Análise da expressão gênica por RT-qPCR (“Reverse Transcriptase Quantitative PCR”)

Para a técnica de RT-qPCR, visando determinar a fase do ciclo de vida do inseto, apresentando maior nível de expressão do gene alvo ou para as análises de silenciamento (redução da expressão) dos genes alvos utilizados nos bioensaios, validar primeiramente, os genes de referência para o CBB. Para a identificação das sequências dos genes de referência utilizar os conhecimentos publicados na literatura científica para os demais insetos coleópteros e aplicar o programa Blast<sup>3</sup> no banco de dados de genes (Genbank- NCBI). Escolhidos os genes de referência, desenhar os respectivos oligonucleotídeos (Figura 5) para utilizar na amplificação por PCR.

Genes	Sequências dos oligonucleotídeos (5´- 3´)
E2	F: GCGTTATGACACCTCGTTAAG R: CCCGATACCTTCCAATACATTC
GAPDH	F: ATCAACTGGAGTCTTTACTACC R: CCTTATCAGCAGGATTGTACG
B-TUB	F: CATCCAGGAATTGTTCAAACG R: GATACCAAGTCATTCATGTTTCG
UBQ	F: CAATTACTCTGGAGGTGGAAC R: TGTATGTTGTAGTCTGAAAGGG
AK	F: CAGATGTGGAAGGTCTTTGG R: GTTGAACCTCTTTGCTCATGC
RPL21	F: AACTCCGCATTCCCGATTAG R: CAGAGTTATGGCAAGTTCGTTTC

**Figura 5.** Listagem de genes de referência para aplicação nas análises de RT-qPCR e sequências dos oligonucleotídeos. **E2**: “prostaglandin E2 Synthase” – gene que tem ação em diversas atividades orgânicas; **GAPDH**: “glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase” - gene envolvido no metabolismo de carboidratos; **B-TUB**: “beta - tubulin” - gene relacionado a estrutura; **UBQ**: “Ubiquitin” - proteína da via do proteossoma, altamente conservada; **AK**: “Arginine kinase Enzyme” - gene crucial para a energia do metabolismo; **RPL21**: “Ribosomal protein L21” - gene envolvido na produção de proteínas ribossômicas.

<sup>3</sup> Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Em continuidade, para a determinação do nível de expressão dos genes alvos selecionados, em cada fase do ciclo de vida ou para determinar o nível de expressão gênica dos alvos nos insetos sobreviventes dos bioensaios, aplicar as seguintes etapas:

- a. Extração do RNA total dos insetos utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) e o protocolo descrito acima;
- b. Síntese do cDNA seguindo o protocolo do Kit de transcrição reversa aplicando a enzima M-MLV (Invitrogen, Ontario, Canada) (descrito acima);
- c. Análise de RT-qPCR: a partir da amostra de cDNA diluída (1:10) e utilizando o kit qPCR Green Master (Cellco, São Carlos, Brasil). Adicionar oligonucleotídeos específicos (10  $\mu$ M) para os genes alvo ou para os genes de referência. A reação é realizada no termociclador com a seguinte programação: “Hold stage”: 50 °C - 2 min, 95 °C - 10 min. “PCR stage” (40x): 95 °C - 15 seg, 60 °C - 1 min. “Melt curve stage”: 95 °C - 15 seg, 60 °C - 1 min, 95 °C - 1 seg. Para a análise dos dados (RAW Data) utilizar o programa do fabricante do termociclador. Para este estudo, a análise de normalização dos dados e determinação da eficiência dos oligos foi realizada no programa Miner<sup>4</sup>. Os valores relativos de expressão gênica são obtidos no programa SATqPCR<sup>5</sup>, indicando ser positiva para o silenciamento gênico, dependendo dos resultados estatísticos ( $p$ -value  $\leq$  0.05) de Anova, Teste-t e Tukey.

## Síntese das moléculas de dsRNAs específicos

Na tecnologia de RNAi, considerando o cenário dos insetos praga, o RNA total, no interior das células, é utilizado como

---

<sup>4</sup> Disponível em: <http://miner.ewindup.cn/miner/>

<sup>5</sup> Disponível em: <https://satqpcr.sophia.inrae.fr/cqi/home.cqi>



molde para produzir a fita simples de DNA por ação da enzima transcriptase reversa. Em seguida, o RNA é degradado e o DNA de fita simples fica livre no citoplasma das células. Neste ambiente, a enzima transforma o DNA fita simples em dupla hélice originando os dsRNAs.

Na metodologia desenvolvida para o caso do CBB, para a síntese das moléculas de dsRNAs específicos, partindo do RNA total das fêmeas adultas, utiliza-se a enzima transcriptase reversa M-MLV (200 U/ $\mu$ L, Invitrogen, Ontário, Canadá) e o protocolo (descrito acima) para a “Síntese de cDNA”. O procedimento para a síntese dos dsRNAs envolve as seguintes etapas:

### **Amplificação dos fragmentos dos DNAs (específicos para o CBB)**

Para o desenho dos oligonucleotídeos específicos e amplificação dos fragmentos das sequências alvo, com tamanho variado (160 a 500 pares de bases), pode ser utilizado o servidor PrimerQuest<sup>6</sup>, aplicando os parâmetros para favorecer baixa porcentagem de ligações GC, de modo a não influenciar na estabilidade do dsRNA (min. 35% e máx. 55% de GC). Na extremidade 5' dos oligos adiciona-se a sequência do promotor da enzima Polimerase T7: 5'TAATACGACTCACTATAGGG 3'.

Na reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para a amplificação dos fragmentos dos genes alvo, o cDNA da broca-docafé (1000 ng) é utilizado como “molde”. Para a análise do produto da PCR é realizada por eletroforese utilizando gel de agarose 1%. Quando o perfil eletroforético em gel de agarose apresentar uma só banda, o produto da PCR pode ser utilizado diretamente na síntese do dsRNA. Alternativamente, como realizado no desenvolvimento da presente metodologia, a banda correspondente ao sinal de amplificação com o tamanho planejado é recortada e o DNA extraído da agarose utilizando-se o Kit QIAquick gel extraction (QIAGEN, Hilden, Germany) e o protocolo descrito pelo fabricante. Em continuidade, o DNA pode ser subclonado, por exemplo, no vetor pGEMt-easy (Promega,

---

<sup>6</sup> Disponível em: <https://www.idtdna.com/pages/tools/primerquest>

Madison, Estados Unidos) e o vetor resultante utilizado para a transformação de bactérias (*Escherichia coli*) (Figura 6).

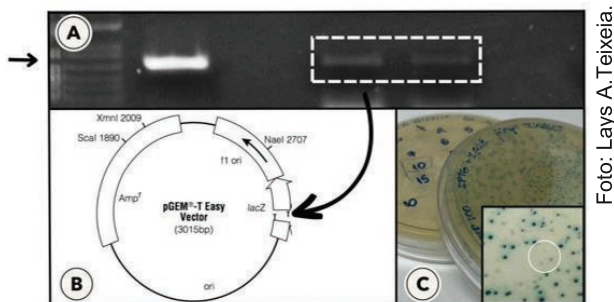


Foto: Lays A. Teixeira.

**Figura 6.** Esquema ilustrativo mostrando a amplificação do fragmento específico para a broca-do-café e a clonagem em vetor comercial. Análise de eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR mostrando a banda correspondente ao fragmento específico do gene G2 (467 bp), comparado com o produto da PCR partindo de amostra de DNAg (seta). A linha tracejada indica o material que foi recortado do gel para extração do DNA (A). A seta indica a posição de inserção do DNA (fragmento específico) no vetor comercial pGEMT-easy (B). Colônias de bactérias crescidas em meio LB após a transformação genética, utilizando o vetor contendo o fragmento alvo específico (C). As colônias brancas foram confirmadas por PCR como transformadas e então, utilizadas para a extração do DNA a ser aplicado na síntese de dsRNA.

Este procedimento tem a vantagem de possibilitar o armazenamento do fragmento gênico específico de forma estável, por tempo indeterminado, a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A partir do inóculo contendo a bactéria transformada é realizada a extração do DNA, utilizando o Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Hilden, Germany) e o protocolo do fabricante. Em seguida, o DNA é submetido ao sequenciamento automático para confirmação da sequência, após a análise de alinhamento com a sequência do gene alvo. O DNA pode ser utilizado imediatamente na reação para a síntese do dsRNA ou armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para posterior utilização.

## Reação de Transcrição in vitro da dupla fita de RNA: síntese do dsRNA

Na presente Metodologia, para a síntese dos dsRNAs alvo, utilizou-se o Kit de transcrição in vitro HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Estados Unidos) ou alternativamente, o Kit MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Thermofischer Scientific, Hilden, Germany).

Para uma reação de transcrição in vitro misturar os seguintes reagentes fornecidos pelos fabricantes dos kits: 1,5 µL de ATP; 1,5 µL de CTP; 1,5 µL de GTP; 1,5 µL de UTP; 1,5 µL de BFF e 2,0 µL da enzima T7 transcriptase reversa. Adicionar 1000 ng do DNA específico e água (*RNAse free*) em quantidade suficiente para completar 20 µL (volume final). Incubar a reação em 37 °C, por 16h.

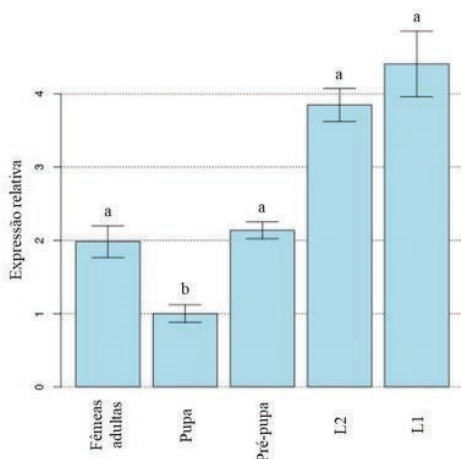
Em seguida, purificar o produto da reação de transcrição in vitro da seguinte forma:

- a. Adicionar 1 µL da enzima DNase I Turbo 2 U/µL (Thermofischer Scientific, Hilden, Germany) e incubar a 37°C, 15 min.
- b. Seguir com incubação a 80 °C, por 8 min e, então, 5 min em temperatura ambiente (25 °C).
- c. Adicionar 67 µL de água (*RNAse free*) e, em seguida, 10 µL de acetato de sódio (fornecido pelo kit), para interromper a reação.
- d. Adicionar igual volume (~160 µL) de Clorofil (Clorofórmio: Álcool isoamílico 24:1), homogeneizar imediatamente em Vortex (30 seg) e centrifugar a 13.000 rpm, 4 °C, 15 min. Recolher a fase superior e colocar em um microtubo (1,5 mL).
- e. Adicionar 1 volume (~100 µL) de Isopropanol (-20 °C) misturando delicadamente e incubar a -20 °C, 1h 30 min.
- f. Centrifugar por 20 min a 14.000 rpm, 4 °C. Recolher o sobrenadante e descartar.

- g. Ao material precipitado, adicionar 500  $\mu\text{L}$  de Etanol 70% (-20  $^{\circ}\text{C}$ ) e centrifugar 14.000 rpm, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min. Recolher a fase superior (etanol) e descartar. Seguir com a centrifugação 13.000 rpm, 4  $^{\circ}\text{C}$ , por 5 min.
- h. Liofilizar o material precipitado utilizando concentrador a vácuo e temperatura ambiente, por 3 min.
- i. Dissolver o precipitado com 25  $\mu\text{L}$  de água (*RNAse free*, 37  $^{\circ}\text{C}$ ), incubar a 75  $^{\circ}\text{C}$ , por 15 min e, em seguida, resfriar em temperatura ambiente, por aproximadamente 5 min.
- j. Armazenar as amostras de dsRNA a -20  $^{\circ}\text{C}$ , para uso posterior.

Para determinar a concentração dos dsRNAs, diluir as amostras 10 x e realizar a leitura em espectrofotômetro (por exemplo, Nanodrop (Eppendorf, AG, Germany)). Para a análise de integridade das amostras dos dsRNAs utilizar eletroforese de gel de agarose 1%.

No caso do CBB, os dsRNAs sintéticos foram aplicados nos bioensaios para avaliação do efeito fenotípico ou do efeito de redução da expressão dos genes alvo específicos. A Figura 7 exemplifica um resultado da análise de expressão, utilizando a técnica de RTqPCR, para o gene alvo *G5*, selecionado a partir do transcrito do CBB, para as fases do ciclo de vida do inseto: fêmea adulta, pupa, pré-pupa, larva L1 e larva L2. O nível de expressão do gene *G5* foi maior em larvas de 1 $^{\circ}$  e 2 $^{\circ}$  estágios, entretanto, só houve diferença significativa no estágio de pupa. A diferença é facilmente explicada pela quantidade de genes que são menos expressos durante essa fase de desenvolvimento, visto que o objetivo desse estágio é apenas a formação de suas estruturas para alcançar o estágio de desenvolvimento adulto. Esta análise é importante para fundamentar a utilização de fêmeas adultas nos estudos para a avaliação do efeito do gene alvo, nos bioensaios com a dieta artificial.



**Figura 7.** Nível de expressão do gene G5 alvo específico para o CBB obtido pela técnica de RT-qPCR e utilizando os cDNAs das fases do ciclo de vida do *Hypothenemus hampei*. Os testes estatísticos aplicados às amostras foram o Teste-t mostrando diferença significativa entre a amostra pupa x L2 (larva segundo estágio) ( $p=0.03^*$ ) e pupa x L1 (larva primeiro estágio) ( $p=0.04^*$ ), Tukey mostrando diferença significativa entre pupa x L1 ( $p=0.02^*$ ) e pupa x L2 ( $p=0.05^*$ ) e Anova com o valor de  $p=0.02^*$ .

## Bioensaios para avaliação dos dsRNAs alvo específicos

Para se produzir um biocontrole para o CBB, aplicando as tecnologias de RNAi e um sistema ex planta (aplicação de formulações contendo dsRNAs específicos), é fundamental a realização de ensaios de incubação ex vivo aplicando diferentes estratégias, procedimentos e reagentes, de modo que se possa avaliar a habilidade de aumentar a estabilidade das moléculas de dsRNAs e a sua eficiência sobre o inseto alvo.

A realização de experimentos com incubação ex vivo visa a identificação de reagentes que permitam a transfecção (absorção) e possibilitem a proteção da molécula ativa contra ação de degradação, por parte de fatores intrínsecos ao inseto (p. ex. endonucleases) e ou fatores ambientais (altas tempera-

turas, radiações UV, chuva, entre outros). Na metodologia desenvolvida e apresentada neste trabalho, para a avaliação dos dsRNAs sintéticos, visando o controle do CBB, realizou-se bioensaios utilizando os estágios de larva (L1) e de insetos adultos (fêmeas). Como estratégia de entrega, realizou-se a deposição dos dsRNAs candidatos sobre a dieta artificial para alimentação oral do inseto e ou a pulverização (aplicação tópica) de soluções com dsRNA sobre os insetos, como descrito abaixo.

### **Entrega dos dsRNAs em dieta artificial para alimentação oral**

Com o objetivo de avaliar em bioensaios o potencial dos genes alvo para a aplicação no controle do CBB, aplicou-se duas formas diferentes de entrega dos dsRNAs na dieta artificial, como descrito a abaixo.

1. Pequenos pedaços da dieta artificial, cortados com auxílio de uma ponteira estéril (7 mm de diâmetro), foram cuidadosamente acomodados nos poços de uma microplaca (96 poços), de modo a preencher todo o espaço do poço. Em seguida, a dieta foi perfurada ao centro utilizando uma ponteira estéril (1 mm de diâmetro). Nestes furos depositou-se as soluções contendo as moléculas de dsRNAs alvo ou os tratamentos controle (*GFPdsRNA* ou somente água). Após alguns minutos, para a absorção completa da solução de tratamento, foi depositada uma larva L1 por poço/tratamento e os poços da placa foram selados com filme plástico. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, utilizando-se 12 larvas (1 por poço) em cada réplica. A incubação do ensaio deu-se a 25 °C, no escuro, por até 7 dias. Durante o monitoramento do experimento realizou-se o registro do efeito (fenótipo) da alimentação no desenvolvimento da larva.

2. De outra maneira, a dieta artificial sólida foi dissolvida em micro-ondas, até voltar ao seu estado pastoso. Para conservar a textura e a umidade original da dieta, após o seu resfriamento, adicionou-se água estéril em volume a compensar o peso original (antes de ser dissolvida). Logo a seguir, a

solução de dsRNA alvo ou a solução com os tratamentos controle foi adicionada na dieta e, então, a dieta foi dispensada nos poços de uma microplaca (96 poços). Após a solidificação da dieta, as larvas em estágio L1 (uma por poço) foram depositadas sobre a dieta. Os poços da placa selados, como descrito acima. Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas e cada réplica contendo 12 larvas L1, por tratamento. O bioensaio foi incubado por 7 dias, sendo monitorado diariamente.

Na Figura 8 pode-se visualizar o efeito da molécula *G5dsRNA* (alvo específico) entregue na dieta artificial para alimentação das larvas. Observa-se a variação de tamanho no desenvolvimento das larvas alimentadas com dieta contendo o dsRNA alvo, indicando um retardo no seu desenvolvimento (tamanho menor) comparado às larvas não tratadas com o dsRNA alvo (tratamentos controle).

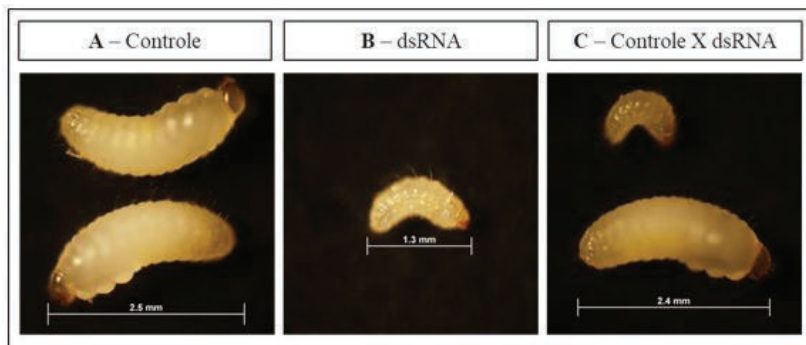


Foto: Lays A. Teixeira.

**Figura 8.** Larvas coletadas do bioensaio realizado com entrega de um dsRNA alvo em dieta artificial, utilizando larvas L1 de *Hypothenemus hampei*. Larvas submetidas ao tratamento controle, contendo apenas dieta artificial, medindo 2,5 mm (A). Larva submetida ao tratamento com dieta adicionada de dsRNA alvo medindo 1,3 mm (B) e foto comparativa do desenvolvimento das larvas: na parte superior - larva desafiada com dieta adicionada de dsRNA alvo e na parte inferior - larva submetida ao tratamento controle (dieta artificial pura).

Apesar da estratégia in vitro, aplicando dieta artificial adicionada de dsRNA alvo, ter neste estudo apresentado um efeito relevante sobre as larvas do CBB, esta forma de entrega do dsRNA não ocorreria na natureza, devido a estrutura do grão

de café e ao hábito endofítico de desenvolvimento do inseto-praga. Neste cenário, o desenvolvimento de uma estratégia para aplicação tópica no cafeeiro, como a pulverização de formulações contendo dsRNAs específicos em partículas, apresenta-se como alternativa mais promissora para auxiliar no controle biotecnológico para o CBB.

### **Aplicação tópica (pulverização) de dsRNAs encapsulados em partículas**

Com objetivo de aplicar dsRNAs encapsulados em partículas, a presente Metodologia descreve a elaboração de formulações, favorecendo as interações entre os compostos: Quitosana (QS) de baixo peso molecular (LWM) (50-190 kDa - Sigma, Mannheim, Germany), Tripolifosfato de sódio (TPP) (Sigma, Mannheim, Germany) e o surfactante Tween-20 (Sigma, Mannheim, Germany).

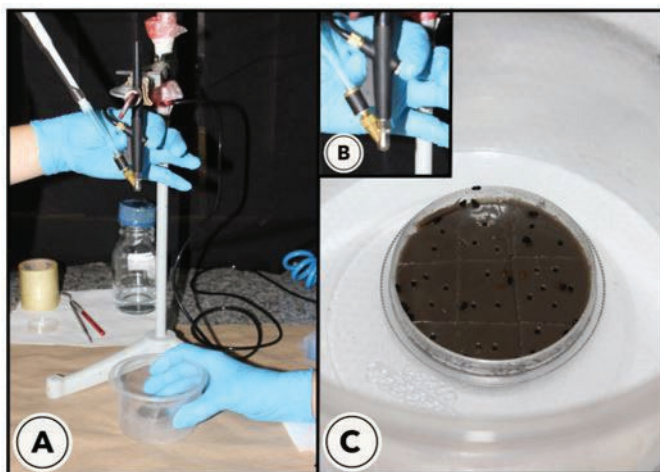
No caso aqui exemplificado, iniciou-se com as proporções 5:1:1 e 10:1:1 para QS:TPP:dsRNA, respectivamente. De forma gradativa, as concentrações dos dsRNAs podem ser alteradas em diferentes formulações para constituição de partículas. Iniciou-se com 1 µg, depois 10 µg e 100 µg de dsRNA.

Para o experimento, exemplificado neste trabalho, prepara-se 500 µL da formulação de partículas, a partir das soluções estoques de: Quitosana (2 mg/mL), TPP (240 ng/µL) e dsRNA (240 ng/µL), aplicados na proporção de 10:1:1. A mistura é realizada de modo que o TPP e o dsRNA são aplicados em volumes iguais (p. ex.: 300 µL de Quitosana + 100 µL de TPP + 100 µL de dsRNA). As soluções são analisadas pela técnica de DLS ("Dynamic Light Scattering") para a determinação dos parâmetros de: potencial Zeta, Pdl (índice de polidispersão); carga (mV) e tamanho (d.nm). Uma nanopartícula deve apresentar dimensão aproximada de 100 nm, carga positiva (~25 mV) e índice de polidispersão (Pdl) dentro dos parâmetros de *Gold Standard*: 0,2 (conforme manual do fabricante Malvern™). Quanto menor o Pdl, maior a homogeneidade das par-



tículas. Após a análise de DLS, a formulação é pulverizada sobre fêmeas adultas do CBB. Cada amostra é constituída de 100 fêmeas adultas e ativas (idade de 2 a 3 meses, a partir da eclosão dos ovos), depositadas nas placas de Petri estéreis (35 mm x 100 mm) contendo a dieta artificial e com sulcos (cortes realizados na dieta) para facilitar a absorção da solução pulverizada.

Para viabilizar a pulverização, em ambiente de laboratório, criou-se um sistema utilizando um aerógrafo e um compressor (Figura 9). As seguintes formulações foram aplicadas neste bioensaio: 1) dsRNA alvo em partículas de quitosana, 2) *GFP-dsRNA* encapsulado partículas (controle do dsRNA) e 3) solução contendo somente a solução de quitosana em água (controle sem o dsRNA). Após a pulverização, aguarda-se por alguns segundos para a absorção da formulação pelos insetos e ou a sua penetração na dieta artificial, evitando o excesso de umidade. Em seguida, as placas são fechadas e incubadas em BOD (25 °C, no escuro) por 5 dias. O experimento é monitorado diariamente. Os insetos sobreviventes de cada tratamento são coletados em microtubos de 1,5 mL (30 indivíduos por tubo) constituindo triplicatas para cada um dos tratamentos. Os insetos coletados de que cada tratamento são submetidos imediatamente à extração do RNA total e às subsequentes etapas para aplicação da técnica de RT-qPCR e determinação do nível de expressão do gene alvo ou então, os insetos podem ser armazenados a -80 °C, para uso posterior.



Fotos: Lays-A. Teixeira e Mariana S. Hildedrand.

**Figura 9.** Ilustração do sistema desenvolvido para a aplicação tópica da formulação de partículas contendo dsRNAs alvo, sobre as fêmeas adultas do CBB. Sistema para pulverização, montado sobre a bancada do laboratório e constituído por: suporte de metal, alças de metal para a fixação do aerógrafo (pulverizador), compressor e válvula para controle da pressão (otimizada em 40 psi) (A). Destaque do local de aplicação da formulação, sendo entregue com o auxílio de uma pipeta no bico do pulverizador e disponibilizando o jato da solução, sobre a placa contendo os insetos (B). A distância entre a placa contendo os insetos em dieta artificial e o bico do pulverizador é de 25 cm. A placa contendo a dieta e as fêmeas após a pulverização, aguardando a absorção da solução pela dieta, para fechamento e armazenamento na incubadora BOD.

## Considerações finais

O desenvolvimento de protocolos e experimentos aplicados em fluxo contínuo, descrito neste trabalho, resultou no estabelecimento de uma metodologia para avaliar *in vitro*, genes específicos que podem vir a ser utilizados no controle biotecnológico da broca-do-café.

A Metodologia foi estabelecida para o caso da broca-do-café, uma vez que descreve protocolos específicos, como por exemplo, os métodos para a extração de DNA e RNA adaptados para diferentes estágios do ciclo de vida da broca-do-café, e resultando em produtos de alta qualidade, em termos de pureza e integridade. Contudo, esta metodologia poderá ser adaptada para outros estudos similares, interessados no controle de diferentes insetos-praga.

Destaca-se no presente estudo, o desenvolvimento de um sistema inédito para bioensaios ex vivo, possibilitando a aplicação tópica de partículas de dsRNAs sobre os insetos, no ambiente de laboratório. O sistema mostrou-se prático e viável para a aplicação e, conseqüentemente, para a avaliação do efeito dos dsRNAs específicos, entregues a broca-do-café por meio de duas formas: pelo contato físico (penetração via cutícula ou vesículas do inseto) e ou pela alimentação oral utilizando a dieta artificial absorvida da solução contendo os genes alvo.

Embora os resultados preliminares dos bioensaios com alimentação oral tenham sugerido a molécula *G5dsRNA* como sendo promissora para ser aplicada no desenvolvimento do controle biotecnológico do CBB, a estratégia de aplicação tópica das formulações contendo os dsRNAs em partículas, é a mais interessante e necessita estudos adicionais para a sua otimização. Com a estratégia de pulverização espera-se que nanopartículas estáveis, carregando dsRNAs específicos, fiquem aderidas a superfície dos frutos e que sejam acessíveis as fêmeas do CBB ao brocarem as sementes do café. As fêmeas assim alimentadas, desde que o dsRNA seja absorvido, deverão ter sua progênie (ciclo de vida) interrompida. Por outro lado, o depósito das partículas pulverizadas sobre a cutícula das fêmeas também representa uma possibilidade para entrega e absorção dos dsRNAs. O polímero quitosana foi o material escolhido neste estudo para produção de partículas devido ao seu custobenefício. Contudo, a aplicação de outros polímeros para

obtenção de nanopartículas encapsulando as moléculas de dsRNAs poderá ser testada para gerar eficácia na entrega dos dsRNAs. Quanto menor a partícula obtida, mais eficiente será a absorção das moléculas de dsRNAs pelas células do inseto, de modo a potencializar o efeito, resultante em silenciamento dos genes alvo.

Por último, mas de grande relevância para a estratégia de desenvolvimento de um controle biotecnológico para a broca-do-café, é o avanço do conhecimento sobre o mecanismo do RNAi em diferentes espécies de insetos. Com isto, será possível melhorar o entendimento e aumentar a eficácia na seleção de sequências gênicas alvo específicas para ser silenciadas, sendo assim, promissoras para reduzir a sobrevivência dos insetos-praga.

## Referências

---

AGUIAR, R. W. S.; MARTINS, E. S.; RIBEIRO, B. M.; MONNERAT, R. G. Cry10Aa protein is highly toxic to *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), an important insect pest in Brazilian cotton crop fields. **Bt Research**, v. 3, n. 4, p. 20-28, 2012.

ALBUQUERQUE, E. V. S.; BEZERRA, C. A.; ROMERO, J. V.; VALENCIA, J. W. A.; VALENCIA-JIMÉNEZ, A.; PIMENTA, L. M.; BARBOSA, A. E. A. D.; SILVA, M. C. M.; MENEGHIM, A. M.; LISEI DE SÁ, M. E. L.; ENGLER, G.; DE ALMEIDA-ENGLER, J.; FERNANDEZ, D.; GROSSI DE SÁ, M. F. Seed-specific stable expression of the alpha-A11 inhibitor in coffee grains and

the in vivo implications for the development of the coffee berry borer. **Tropical Plant Biology**, v. 8, p. 98-107, 2015.

ARRAES, F. B. M.; MARTINS-DE-SA, D.; NORIEGA VASQUEZ, D. D.; MELO, B. P.; FAHEEM, M.; DE MACEDO, L. L. P.; MORGANTE, V.; BARBOSA, J. A. R. G.; TOGAWA, R. C.; MOREIRA, V. J. V.; DANCHIN, E. G. J.; SA, M. F. G. de. Dissecting protein domain variability in the core RNA interference machinery of five insect orders. **RNA Biology**, v. 18, n. 11, p. 1-29, 2021.

ARYA, S. K.; SINGH, S.; UPADHYAY, S. K.; TIWARI, V.; SAXENA, G.; VERMA, P. C. RNAi-based gene silencing in *Phenacoccus solenopsis* and its validation by in planta expression of a double-stranded RNA. **Pest Management Science**, v. 77, p. 1796-1805, 2021.

ÁVILA, C. **Agrotóxico endossulfan será banido do Brasil**. 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/noticias/agrotoxicoendossulfan-sera-banido-do-brasil>. Acesso em: 14 jun. 2023.

BARBOSA, A. E.; ALBUQUERQUE, E. V. S.; SILVA, M. C. M.; SOUZA, S.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; VALENCIA, A.; ROCHA, T. L.; GROSSIDE SA, M. F. Alpha amylase inhibitor1 gene from *Phaseolus vulgaris* expressed in *Coffea arabica* plants inhibits alpha amylases from the coffee berry borer pest. **BMC Biotechnology**, v. 10, n. 1, 44, 2010.

BARRERA, J. F.; GOMEZ, J.; ALAUZET, C. Can the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) reproduce by parthenogenesis? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 77, p. 351-354, 1995.

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

BOURTZIS, K.; O'NEILL, S. Wolbachia infections and arthropod reproduction. **BioScience**, v. 48, p. 287-293, 1998.

BRASIL. Secretaria de Política Agrícola. **Estatísticas, exportações e cotações**. 2021. Disponível em: <http://www.consorcio-pesquisacafe.com.br/index.php/imprensa/noticias/420-apresp-dfviiiispcb#a>. Acesso em: jun. 2023.

BRUN, L. O.; GAUDICHON, V.; WIGLEY, P. J. An artificial diet for continuous rearing of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera, Scolytidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 14, n. 5/6, p. 585-587, 1993.

BRUN, L. O.; STUART, J.; GAUDICHON, V.; ARONSTEIN, K.; FRENCH-CONSTANT, R. H. Functional haplodiploidy: a mechanism for the spread of insecticide resistance in an important international insect pest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 9861-9865, 1995.

CAO, M.; GATEHOUSE, J. A.; FITCHES, E. C. A systematic study of RNAi effects and dsRNA stability in *Tribolium castaneum* and *Acyrtosiphon pisum*, following injection and ingestion of analogous dsRNAs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, 1079, 2018.

COLEMAN, A. D.; WOUTERS, R. H. M.; MUGFORD, S. T.; HOGENHOUT, S. A. Persistence and transgenerational effect of plant-mediated RNAi in aphids. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 2, p. 541-548, 2015.

CONSTANTINO, L. M.; NAVARRO, L.; BERRIO, A.; ACEVEDO, F. E.; RUBIO, D.; BENAVIDES, P. Biologic, morphologic, and genetic aspects of *Hypothenemus obscurus* and *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 37, n. 2, p. 173-182, 2011.

COOPER, A. M. W.; YU, Z.; BIONDI, M.; SONGA, H.; SILVER, K.; ZHANG, J.; ZHU, K. Y. Stability of double-stranded RNA in gut contents and hemolymph of *Ostrinia nubilalis* larvae. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p. 169-177, 2020.

DAMON, A. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 90, n. 6, p. 453-465, 2000.

DARLINGTON, M.; REINDERS, J. D.; SETHI, A.; LU, A. L.; RAMASESHADRI, P.; FISCHER, J. R.; BOECKMAN, C. J.; PETRICK, J. S.; ROPER, J. M.; NARVA, K. E.; VÉLEZ, A. M. RNAi for western corn rootworm management: lessons learned, challenges, and future directions. **Insects**, v. 13, n. 1, 57, 2022.

FERREIRA, J. S. **Metodologia de criação massal da broca-do-café com novas dietas artificiais, e potencial de controle com fungos entomopatogênicos**. 2022. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Produção Vegetal) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

FIALHO, R. F.; STEVENS, L. Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 267, p. 1469-1474, 2000.

FIRMINO, A. A. P.; FONSECA, F. C. DE 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.; SILVA, M. C. M.; ENGLER, G.; GROSSI DE SA, M. F. Transcriptome Analysis in Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA Interference in Insect Pests. **Plos One**, v. 8, e85079, 2013.

FLAGEL, L. E.; BANSAL, R.; KERSTETTER, R. A.; CHEN, M.; CARROLL, M.; FLANNAGAN, R.; CLARK, T.; GOLDMAN, B. S.; MICHEL, A. P. Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) transcriptome assembly and genomic analysis of population structure. **BMC Genomics**, v. 14/15, n. 1, 195, 2014.

GUAN, R.; CHU, D.; HAN, X.; MIAO, X.; LI, H. Advances in the development of microbial double-stranded RNA production systems for application of RNA interference in agricultural pest control. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 753790, 2021.

GUAN, R.; HU, S.; LI, H.; SHI, Z.; MIAO, X. The in vivo dsRNA cleavage has sequence preference in insects. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1768, 2018.

GUAN, R.; LI, T.; SMAGGHE, G.; MIAO, X.; LI, H. dsRNA-based pesticides: production, development, and application technology. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, 1197666, 2023.

HURST, G. D. D.; HURST, L. D.; MAJERUS, M. E. N. Cytoplasmic sex ratio distorters, In: O'NEILL, S. L.; HOFFMANN, A.; WERREN, J. H. (Ed.). **Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction**. New York: Oxford University, 1997. p. 125154.



HURST, G. D. D.; JOHNSON, A. P.; HINRICH, J.; SCHULENBURG, G. V. D.; FUYAMA, Y. Male killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperaturesensitive trait with a threshold bacterial density. **Genetics**, v. 156, p. 699-709, 2000.

HUSSAIN, T.; AKSOY, E.; ÇALIŞKAN, M. E.; BAKHSH, A. Transgenic potato lines expressing hairpin RNAi construct of molting-associated EcR gene exhibit enhanced resistance against Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, Say). **Transgenic Research**, v. 28, p. 151-164, 2019.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRIBIOTECH APPLICATIONS. **GM Approval Database**. Disponível em: <https://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/>. Acesso em: 3 ago. 2023.

JIGGINS, F. M.; HURST, G. D. D.; DOLMAN, C. E.; MAJERUS, M. E. N. High-prevalence male-killing *Wolbachia* in the butterfly *Acraea encedana*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 13, p. 495-501, 2000.

KUNTE, N.; MCGRAW, E.; BELL, S.; HELD, D.; AVILA, L. A. Prospects, challenges and current status of RNAi through insect feeding. **Pest Management Science**, v. 76, p. 26-41, 2020.

LAURENTINO, E.; COSTA, J. N. M. **Descrição e caracterização biológica da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari 1867) no Estado de Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004. (Embrapa Rondônia. Documentos, 90).

LEROY, T.; HENRY, A. M.; ROYER, M.; ALTOSAAR, I.; FRUTOS, R.; DURIS, D.; PHILIPPE, R. Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene for resistance to leaf miner. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 382-385, 2000.

LÓPEZ-PAZOS, S. A.; CORTÁZAR GÓMES, J. E.; SERÓN SALAMANCA, J. A. Cry1B and Cry3A are active against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae) **Journal of Invertebrate Pathology** v. 101, 242-245, 2009.

LUCENA-LEANDRO, V. S.; ABREU, E. F. A.; VIDAL, L. A.; TORRES, C. R.; JUNQUEIRA, C.; DANTAS, J., FREIRE, E. V. S. A. Current scenario of exogenously induced RNAi for Lepidopteran agricultural pest control: from dsRNA design to topical application. **International Journal of Molecular Science**, v. 23, n. 24, 15836, 2022.

MAO, J.; ZHANG, P.; LIU, C.; ZENG, F. Co-silence of the coatomer  $\beta$  and v-ATPase A genes by siRNA feeding reduces larval survival rate and weight gain of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 118, p. 71-76, 2015.

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

MÉNDEZ-LÓPEZ, I. S.; BASURTO-RÍOS, R.; IBARRA, J. E. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). **FEMS Microbiology Letters**, v. 226, n. 1, p. 73-77, 2003.

MESQUITA, C. M.; REZENDE, J. E. de; CARVALHO, J. S.; FABRI JÚNIOR, M. A.; MORAES, N. C.; DIAS, P. T.; CARVALHO, R. M. de; ARAÚJO, W. G. de. **Manual do café: distúrbios fisiológicos, pragas e doenças do cafeeiro (*Coffea arábica* L.)**. Belo Horizonte: Emater-MG, 2016.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER. **Bacillus thuringiensis (Bt) fact sheet.** Disponível em: <http://npic.orst.edu/factsheets/btgen.html>. Acesso em: 3 ago. 2023.

NAVARRO-ESCALANTE, D.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, E. M.; NUÑEZ, J.; ACEVEDO, F. E.; BERRIO, A.; CONSTANTINO, L. M.; PADILLA-HURTADO, B. E.; MOLINA, D.; GONGORA, C.; ACUÑA, R.; STUART, J.; BENAVIDES, P. A coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) genome assembly reveals a reduced chemosensory receptor gene repertoire and male-specific genome sequences. **Scientific Report**, v. 11, p. 4900-4917, 2021.

NORIEGA-VASQUÉZ, D. D. **Estratégias para aumentar a eficiência do RNA Interferente visando o controle da lagarta *Helicoverpa armígera* e o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*), pragas do algodão no Brasil.** 2022. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade de Brasília, DF.

NORIEGA, D. D.; ARIAS, P. L.; BARBOSA, H. R.; ARRAES, F. B. M.; OSSA, G. A.; VILLEGAS, B.; COELHO, R. R.; ALBUQUERQUE, E. V. S.; TOGAWA, R. C.; GRYNBERG, P. WANG, H.; VÉLEZ, A. M.; ARBOLEDA, J. W.; GROSSI-DE-SA, M. F.; SOLVA, M. C. M.; VALENCIA-JIMÉNEZ, A. Transcriptome and gene expression analysis of three developmental stages of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 12804, 2019.

O'NEILL, S. L.; HOFFMANN, A. A.; WERREN, J. H. (Ed.). **Influenential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction.** New York: Oxford University, 1997.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ. **Relatório sobre o mercado do café:** março 2021. Disponível em:

<https://www.ico.org/documents/cy2021-22/cmr-0322-p.pdf>.  
Acesso em: 3 ago. 2023.

PERTHUIS, B.; VASSAL, J. M.; FENOUILLET, C.; LEROY, T. Cry1Ac insecticidal protein levels in genetically modified *Coffea canephora* Pierre coffee plants were negatively correlated with the growth speed in a field experiment. **Euphytica**, v. 202, p. 373-383, 2015.

PETRÔNIO, M. S.; BARROS-ALEXANDRINO, T. T.; LIMA, A. M. F.; ASSIS, O. B. G.; NAGATA, A. K. I.; NAKASU, E. Y.; TIERA, M. J.; PILON, L. Physicochemical and toxicity investigation of chitosanbased dsRNA nanocarrier formation. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 5266-5279, 2022.

PORTILLA, M. Desarrollo y evaluación de una dieta artificial para la cría masiva de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Revista Cenicafé**, v. 50, p. 24-38, 1999.

PORTILLA, M.; STRETT, D. Nuevas técnicas de producción masiva automatizada de *Hypothenemus hampei* sobre la dieta artificial Cenibroca modificada. **Revista Cenicafé**, v. 57, p. 37-50, 2006.

PORTILLA, M.; STRETT, D. Biological responses of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) on Cenibroca artificial diet at different moisture content levels and relative humidities. **Florida Entomologist**, v. 105, n. 2, p. 137-144, 2022.

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

RIBEIRO, T. P.; ARRAES, F. B. M.; LOURENÇO-TESSUTTI, I. T.; SILVA, M. S.; LISEI-DE-SÁ, M. E.; LUCENA, W. A.; MACEDO, L. L. P.; LIMA, J. N.; SANTOS, A. R. M.; ARTICO, S.; ALVES-FERREIRA, M.; MATTAR SILVA, M. C.; GROSSI DE

SA, M. F. Transgenic cotton expressing Cry10Aa toxin confers high resistance to the cotton boll weevil. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, p. 1-13, 2017.

RIBEIRO, T. P.; VASQUEZ, D. D. N.; MACEDO, L. L. P. de; LOURENCO, I. T.; VALENÇA, D. C.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; PAES-DE-MELO, B.; RODRIGUES-SILVA, P. L.; FIRMINO, A. A. P.; BASSO, M. F.; LINS, C. B. J.; NEVES, M. R.; MOURA, S. M.; TRIPODE, B. M. D.; MIRANDA, J. E.; SILVA, M. C. M. da; SA, M. F. G. de. Stabilized double-stranded RNA strategy improves cotton resistance to CBW (*Anthonomus grandis*). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, 13713, 2022.

SANTOS-ORTEGA, Y.; FLYNT, A. Double-strand RNA (dsRNA) delivery methods in Insects: *Diaphorina citri*. **Methods in Molecular Biology**, v. 2360, p. 253-277, 2022.

SHUKLA, J. N.; KALSI, M.; SETHI, A.; NARVA, K. E.; FISH-ILEVICH, E.; SINGH, S.; MOGILICHERLA, K.; PALLI, S. R. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran. **RNA Biology**, v. 13, n. 7, p. 656-69, 2016.

SONG, H.; FAN, Y.; ZHANG, J.; COOPER, A. M.; SILVER, K.; LI, D.; MA, E.; ZHU, K. Y.; ZHANG, J. Contributions of dsRNases to differential RNAi efficiencies between the injection and oral delivery of dsRNA in *Locusta migratoria*. **Pest Management Science**, v. 75, n. 6, p. 1707-1717, 2019.

SOUZA, M. S.; COSTA, J. N. M.; ESPINDULA, M. C.; SILVA, A. A. Performance of baited traps for integrated management of *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytinae) in a conilon coffee crop in Rondônia State, Brazil. **EntomoBrasilis**, v. 13, e913, 2020.

SOUZA, R. A. de. **Métodos de manejo para broca-do-café, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)**. 2019. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES.

VALENCIA-LOZANO, E.; CABRERA-PONCE, J. L.; GÓMEZ-LIM, M. A.; IBARRA, J. E. Development of an efficient protocol to obtain transgenic coffee, *Coffea arabica* L., expressing the Cry10Aa toxin of *Bacillus thuringiensis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, 5334, 2019.

VEGA, F. E.; BENAVIDES, P.; STUART, J. A.; O'NEILL, S. L. Wolbachia infection in the Coffee Berry Borer (Coleoptera: Scolytidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 95, n. 3, p. 374-378, 2002.

VEGA, F. V.; BROWN, S. M.; CHEN, H.; SHEN, H.; NAIR, M. B.; CEJANAVARRO, J. A.; EOIN, L.; BRODIE, E. L.; INFANTE, F.; DOWD, P. F.; PAIN, A. Draft genome of the most devastating insect pest of coffee worldwide: the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **Scientific Reports**, v. 5, 12525, 2015.

VÉLEZ, A. M.; FISHILEVICH, E. The mysteries of insect RNAi: a focus on dsRNA uptake and transport. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 151, p. 25-31, 2018.

VILLACORTA, A. Dieta meridica para criação de sucessivas gerações de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 14, p. 315-319, 1985.

VILLACORTA, A.; BARRERA, J. F. Nova dieta meridica para criação de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 22, p. 405-409, 1993.

WATERHOUSE, D. F.; NORRIS, K. R. **Biological control: pacific prospects: supplement 1**. Canberra: Australian Centre for

International Agricultural Research, 1989. (ACIAR Monograph, 12).

WEI, S.; WANG, L.; LIN, M. Temperature-dependent biology and population performances of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) on artificial diet. **Insects**, v. 14, n. 6, 499, 2023.

WINNEBECK, E. C.; MILLAR, C. D.; WARMAN, G. R. Why does insect RNA look degraded? **Journal of Insect Science**, v. 10, 159, 2010.

YOU, L.; ZHANG, F.; HUANG, S.; MERCHANT, A.; ZHOU, X.; LI, Z. Over-expression of RNA interference (RNAi) core machinery improves susceptibility to RNAi in silkworm larvae. **Insect Molecular Biology**, v. 29, v. 4, p. 353-362, 2020.



**CGPE 18591**