

**Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Genética e Evolução
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular**

Aline Minali Nakamura

Estudos de expressão em genes potencialmente envolvidos no processo reprodutivo em *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae)

São Carlos

2014

Aline Minali Nakamura

Estudos de expressão em genes potencialmente envolvidos no processo reprodutivo em *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, *campus* São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito

São Carlos

2014

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N163e Nakamura, Aline Minali
Estudos de expressão em genes potencialmente envolvidos no processo reprodutivo em *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) / Aline Minali Nakamura. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
114 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. *Anastrepha obliqua*. 2. qPCR. 3. Expressão diferencial. 4. Controle genético. I. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

Dissertação de Mestrado de

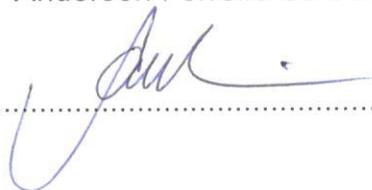
ALINE MINALI NAKAMURA

Banca Examinadora

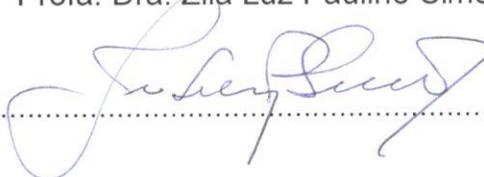
Dr. Reinaldo Alves de Brito



Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha



Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões



SÃO CARLOS – SP
2014

A todos que participaram deste processo de aprendizagem

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

ao meu orientador Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito, meus profundos agradecimentos, por ter aceitado que eu desenvolvesse este projeto, por ter depositado sua confiança no meu trabalho, por ser presente sempre que necessário e por todos os ensinamentos transmitidos, não só científicos, como para toda a vida, que contribuíram valiosamente com meu crescimento. Serei sempre grata a tudo. Muito obrigada.

ao Prof. Dr. Francis Nunes, por todo o apoio e pela imensa paciência ao me orientar, acompanhar, ensinar, ouvir, transmitir. Obrigada pelas horas e horas de conversas e planejamentos. Foi muito bom ter a oportunidade de trabalhar com você.

à banca examinadora, cuja honrosa presença e avaliação serão de grande contribuição para este trabalho.

ao Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos e ao Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular pelo apoio institucional para o desenvolvimento deste projeto.

à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de estudos e pelo suporte financeiro que subsidia o Laboratório de Genética de Populações e Evolução.

às mosquinhas, que nunca foram consultadas se queriam colaborar com este projeto, mas que sem saber ajudam a contruir conhecimento.

aos meus amigos e companheiros do grande “Labevil”, tanto os atuais quanto os da velha guarda, pelas horas, dias, anos de companheirismo e amizade. Pelos muitos litros de cerveja e café. Pelas centenas de horas dentro do insetário trabalhando, contando causos e piadas. Obrigada por proporcionarem um ambiente de trabalho invejável para muitos.

à turminha do real time, sem eles esse trabalho não existiria. É o nosso trabalho. Felipe, o real time guy, como eu fiquei feliz em saber que ele entraria no nosso grupo de pesquisa, essa felicidade foi por água abaixo ao conhecê-lo melhor (eu to brincando!), mas sim, só tenho a agradecer por trabalharmos juntos. Samira, sempre foi a mãezona preocupada, me deu inúmeros conselhos, trabalhou duro, é a expert das extrações de RNA. Obrigada por tudo, Samiruda, inclusive pelas horas e horas agradáveis (não to brincando) sentadas lado a lado no fluxo, renderam boas risadas e eternas lembranças. Crisofícea, a Padawan, por ter não ter me matado quando viu a furada que entrou ao aceitar trabalhar comigo. Muito obrigada Cris, por ser tão prestativa e tão amiga tão confidente. Muito obrigada pelas eternas filosofias, aprendizados, marmitas, recreios e pela pasta de filmes no seu computador. E Ider, que mesmo distante fisicamente, consegue estar sempre por perto. Muito do que eu sou hoje dentro do laboratório eu devo a ele.

ao André, pelo seu imenso coração. Desde que entrei no laboratório, há seis anos, o André sempre foi aquele que nunca mediu esforços pra me ajudar, em tudo, em resolver problemas de bancada, em fazer engenhocas pra tornar a vida das pessoas mais prática e feliz, em ajudar mesmo quando ele diz não saber como, em dar apoio moral e o abraço que cura qualquer desespero e falta de esperança na vida (rsrs). Ele é minha base emocional dentro no laboratório. Bondade e compaixão definem esta pessoa e sou muito sortuda por ter trabalhado com ele.

à todos os meus amigos que me aguentaram e muito, durante este processo. E o principal, obrigada por serem amigos daqueles, pro resto da vida. Isabela, Lontra, Ferzoca, Pedro, Cabeça, Jugger, Helena, Gui, Vini e Walter amo vocês.

ao Rodrigo, essencial em muitos os momentos, obrigada pela amizade, companheirismo, muito pastel e muito sorvete. Sempre foi o primeiro a me chacoalhar, pegar na minha mão e dizer vai, e faz! E eu ia. Tanto ia que aqui está o trabalho, pronto. Disso jamais me esquecerei.

à Ludwig van Beethoven, por ter sido o gênio que foi, por ter me proporcionado a melhor trilha sonora para o meu mestrado. Responsável por trazer a tranquilidade nos estudos e a inspiração no trabalho.

aos meus irmãos Paulo e Robinson. Eu daria a minha vida por eles. Obrigada por serem o melhor pedaço de mim, o que me faz sentir segura, o que me faz ter certeza de que sozinha não ficarei nunca.

aos meus pais, para eles sempre dedicarei todas as minhas conquistas e por eles sempre me esforçarei para ser uma pessoa melhor. Me faltam palavras para agradecer por tudo que eles são na minha vida.

Muito obrigada.

“Fazer todo bem que se possa, amar sobretudo a liberdade e, mesmo que seja por um trono, jamais renegar a verdade”

Ludwing van Beethoven

RESUMO

A maioria das espécies do gênero *Anastrepha* é endêmica à região neotropical e diversas têm importância econômica por causar grandes prejuízos às culturas de frutos. O Brasil tem baixa inserção no mercado internacional de frutas frescas devido às exigências por produtos de qualidade e sem resíduos de agrotóxicos, o que força o aprimoramento das técnicas de controle de inseto-praga. Uma das alternativas é a Técnica do Inseto Estéril (SIT), que visa à redução da população da praga pela liberação em massa de insetos estéreis. Porém, a esterilização por radiação traz muitos efeitos colaterais, diminuindo a competitividade dos machos liberados em relação aos machos selvagens. Por esse motivo, diferentes estratégias têm sido utilizadas como a produção de indivíduos transgênicos visando não só a esterilidade como também o aumento do vigor apresentado por esses machos em relação aos selvagens. Para isso, uma abordagem importante seria o estudo de genes envolvidos no processo reprodutivo. Neste trabalho selecionamos nove genes para estudos de expressão por qPCR candidatos de nossos dados de transcriptomas com potencial de estarem envolvidos no processo reprodutivo em *Anastrepha* por pertencerem a famílias já relacionadas ao processo reprodutivo, além de apresentarem expressão diferencial entre os transcriptomas de machos virgens e machos pós-cópula. Como nenhum estudo de qPCR havia sido feito ainda em *Anastrepha*, testamos diversos genes de referência para a normalização dos dados de expressão. Os genes *rpl18*, *rps17* e *ef1a* foram considerados adequados e padronizados para estudos de expressão entre fases de vida de *A. obliqua*. As análises de expressão por qPCR revelaram que os genes *AttA*, *Obp56a* e *Obp99c* apresentam padrões de expressão interessantes para investigação e aumentam o potencial desses genes estarem de fato participando do processo reprodutivo. *Obp56a* apresentou maior expressão em fêmeas virgens em relação às pós-cópula. Já *AttA* e *Obp99c* apresentaram maior expressão em machos em relação às fêmeas, fato que pode ser interessante para técnicas de controle genético. Aplicamos a técnica de silenciamento por interferência por RNA nesses genes, com o objetivo de trazer informações sobre a participação desses genes na reprodução. Dessa forma nossos resultados apontam para três genes candidatos que podem ser interessantes para técnicas de controle de populações, com potencial de estar participando do processo reprodutivo o que estimula futuras investigações destes em *Anastrepha obliqua*.

Palavras-chave: *Anastrepha obliqua*, qPCR, expressão diferencial, controle genético

ABSTRACT

The majority of species in the genus *Anastrepha* is endemic to the Neotropics and many are of great economic importance because they inflict great damage to several different fruit crops. Brazil has low insertion in international markets because of the demand for quality products with no pesticide residues, which force the improvement of control techniques. Thus, an alternative to insect pests control is the Sterile Insect Technique (SIT), which reduces the pest population by mass release of sterile insects. However, sterilization by radiation has many side effects, reducing the competitiveness of released males relative to wild males. For this reason, different strategies have been used, such as the production of transgenic individuals not only in order to sterility but also increasing the vitality presented by these males compared to wild males. To accomplish that, an important approach could be the study of genes involved in the reproductive process. In this work, we selected nine candidate genes for expression studies of our transcriptome data, which have the potential of being involved in the reproductive process in *Anastrepha* because they belong to gene families that have already been associated to the reproductive process, and showed differential expression between the contrast of virgin and post-mating of transcriptome data in *Anastrepha* flies. Since no qPCR study has been done to date in *Anastrepha*, we tested several reference genes for normalization of expression data. The genes *Rpl18*, *Rps17* and *Efla* were deemed suitable and used here to standardize studies of expression between life stages of *A. obliqua*. The qPCR gene expression analysis revealed interesting gene expression patterns for *AttA*, *Obp56a* and *Obp99c*, which increases the potential of these genes being involved in the reproductive process. *Obp56a* showed a higher expression in virgin females in contrast to post-mating, whereas *AttA* and *Obp99c* showed higher expression in male in contrast to females, which may be interesting for genetic control techniques. We applied the RNAi silencing technique with *AttA* and *Obp99c*, aiming to generate information about the participation of these genes in reproduction. Thus, our results pointed for three candidate genes that could be interesting for population control techniques, with potential of being involved in the reproductive process, which stimulates further researches in *Anastrepha obliqua*.

Keywords: *Anastrepha obliqua*, qPCR, differential expression, genetic control

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de vida de moscas-das-frutas do gênero <i>Anastrepha</i>	16
Figura 2.	Expressão gênica dos oito genes candidatos a gene de referência para estudos de expressão por qPCR em <i>A. obliqua</i> ao longo das fases de vida.....	54
Figura 3.	Variação dos níveis de expressão dos candidatos a gene de referência para estudos de expressão por qPCR em <i>A. obliqua</i> ao longo das fases de vida...	55
Figura 4.	Análise de estabilidade da expressão gênica ao longo das fases de vida de <i>A. obliqua</i> de oito genes candidatos a gene de referência de acordo com quatro algoritmos.....	56
Figura 5.	Ranque dos genes candidatos a gene de referência de acordo com a estabilidade da expressão gênica baseado no programa <i>RefFinder</i>	57
Figura 6.	Expressão normalizada de nove genes candidatos potencialmente associados ao processo reprodutivo em <i>A. obliqua</i>	65
Figura 7.	Expressão relativa normalizada de cada grupo do experimento de silenciamento do gene <i>Obp99c</i> em <i>A. obliqua</i>	74
Figura 8.	Expressão relativa normalizada de cada grupo do experimento de silenciamento do gene <i>AttA</i> em <i>A. obliqua</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Eficiência de reação dos oito genes candidatos a gene de referência para estudos de expressão por qPCR em <i>A. obliqua</i> ao longo das fases do desenvolvimento, por análise de curva padrão.....	53
Tabela 2.	Genes escolhidos para estudo por apresentarem diferença de expressão significativa entre machos virgens e machos pós-cópula segundo os dados dos transcriptomas de <i>A. fraterculus</i>	61
Tabela 3.	Eficiência de reação dos nove genes escolhidos para estudos de expressão por qPCR em <i>A. obliqua</i> ao longo de fases do desenvolvimento, por análise de curva padrão.....	63

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Curva padrão e curva de desnaturação (<i>melting</i>) para os oito genes candidatos a genes de referência para estudos de expressão por qPCR em <i>A. obliqua</i>	94
Anexo 2.	Valores de quantificação da expressão relativa para os oito genes candidatos a genes de referência para estudos de expressão por qPCR em <i>A. obliqua</i>	96
Anexo 3.	Fragmento referente à CDS do gene similar a <i>AttA</i> em <i>D. melanogaster</i>	98
Anexo 4.	Fragmento referente à CDS do gene similar a <i>CG11912</i> em <i>D. melanogaster</i>	100
Anexo 5.	Fragmento referente à CDS do gene similar a <i>CG14645</i> em <i>D. melanogaster</i>	101
Anexo 6.	Fragmento referente à CDS do gene similar a <i>CG30025</i> em <i>D. melanogaster</i>	102
Anexo 7.	Fragmento referente à CDS do gene similar a <i>Jon65Aiv</i> em <i>D. melanogaster</i>	103
Anexo 8.	Fragmento referente à CDS do gene similar a <i>Obp19d</i> em <i>D. melanogaster</i>	105
Anexo 9.	Fragmento referente à CDS do gene similar a <i>Obp56a</i> em <i>D. melanogaster</i>	106
Anexo 10.	Fragmento referente à CDS do gene similar a <i>Obp99c</i> em <i>D. melanogaster</i>	107
Anexo 11.	Fragmento referente à CDS do gene similar a <i>θTry</i> em <i>D. melanogaster</i>	109
Anexo 12.	Curva padrão e curva de desnaturação (<i>melting</i>) para os nove genes candidatos em <i>A. obliqua</i>	110
Anexo 13.	Valores de quantificação da expressão relativa para os oito genes candidatos a genes de referência para estudos de expressão por qPCR em <i>A. obliqua</i>	113

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ANEXOS.....	XI
INTRODUÇÃO.....	15
1 – O gênero <i>Anastrepha</i> e sua importância econômica.....	15
2 – Controle biológico e controle genético.....	18
3 – Outras estratégias de controle de insetos-praga.....	20
4 – A busca por genes candidatos.....	22
5 – RNA de interferência: maquinaria de silenciamento gênico na elucidação de funções gênicas.....	24
OBJETIVOS.....	27
Objetivos específicos.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
1 – Criação das moscas.....	28
2 – Geração dos transcriptomas.....	28
3 – Escolha dos genes e obtenção dos fragmentos.....	29
3.1 – Escolha dos genes e desenho de <i>primers</i>	29
3.2 – Amplificação dos fragmentos por PCR.....	30
3.3 – Purificação por precipitação com polietilenoglicol.....	31
3.4 – Clonagem.....	31
3.5 – Sequenciamento.....	32

4 – Investigação e padronização dos genes de referência para PCR quantitativa em tempo real (qPCR) em <i>A. obliqua</i>	33
4.1 – Amostragem.....	33
4.2 – Extração de RNA total.....	34
4.3 – Purificação por precipitação com cloreto de lítio.....	35
4.4 – Produção de cDNA.....	36
4.5 – Escolha dos genes candidatos à referência para qPCR e desenho dos <i>primers</i>	36
4.6 – qPCR.....	37
4.6.1 – Teste de eficiência de reação.....	38
4.6.2 – Teste de uniformidade de expressão.....	38
4.7 – Análises de estabilidade gênica.....	38
5 – Quantificação relativa da expressão dos genes candidatos por qPCR em <i>A. obliqua</i>	40
5.1 – Desenho dos <i>primers</i> de qPCR.....	40
5.2 – Expressão dos genes candidatos nos diferentes perfis.....	41
6 – RNA de interferência.....	42
6.1 – Produção <i>in vitro</i> de dsRNA.....	42
6.1.1 – Desenho dos <i>primers</i>	43
6.1.2 – Amplificação dos fragmentos, clonagem e seqüenciamento.....	44
6.1.3 – Extração dos plasmídeos – <i>miniprep</i>	45
6.1.4 – PCR.....	46
6.1.5 – Produção de dsRNA.....	47
6.2 – Injeção de dsRNA em moscas adultas.....	48
6.3 – Avaliação da eficiência do silenciamento.....	49
6.3.1 – Extração de RNA e produção de cDNA.....	49

6.3.2 – qPCR e análise estatística dos dados de expressão.....	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
1 – Padronização dos genes de referência para qPCR em <i>A. obliqua</i>	52
2 – Escolha dos genes candidatos.....	59
3 – Padrão de expressão dos genes candidatos em <i>A. obliqua</i>	63
3.1 – Proteínas ligantes a odores.....	67
3.2 – Proteínas do sistema imune.....	70
4 – Experimentos de RNAi com os genes <i>AttA</i> e <i>Obp99c</i>	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXOS.....	93

INTRODUÇÃO

1 – O gênero *Anastrepha* e sua importância econômica

A família Tephritidae de moscas-das-frutas é composta por mais de 5.000 espécies em todo o mundo das quais aproximadamente 14.000 utilizam frutas frescas em seu desenvolvimento (Malacrida *et al.* 2007). Desta grande variedade de moscas-das-frutas, 250 espécies foram associadas a frutas e verduras comercialmente produzidas, sendo quatro gêneros, dentre eles *Ceratitis*, *Anastrepha*, *Bactrocera* e *Rhagoletis*, de grande importância por serem caracterizadas como expressivas pragas agrícolas (White & Elson-Harris 1992).

O gênero *Anastrepha*, o maior da família Tephritidae, tem uma distribuição abrangente, com a maioria das espécies endêmica à região Região Neotropical (América do Sul, Central e México), mas podendo ocorrer também ao sul da Região Neártica. Na América do Sul, o gênero só não está estabelecido no Chile, onde ocorre esporadicamente em algumas áreas ao norte do deserto do Atacama na fronteira com o Peru (Malavasi *et al.* 2000). Das 213 espécies reconhecidas para o gênero *Anastrepha*, 115 estão distribuídas no Brasil sendo que 33 são exclusivas do território brasileiro; há registros da presença de pelo menos uma espécie em todos os 26 estados nacionais; e juntas estas espécies hospedam, no Brasil, 265 espécies de plantas pertencentes a um total de 45 famílias de hospedeiros (Zucchi 2008; Silva *et al.* 2010).

O ciclo de vida dessas moscas consiste em oviposição pelas fêmeas em frutos carnosos, as larvas emergem dos ovos entre o primeiro e o terceiro dia e se alimentam dos frutos provocando seu apodrecimento e queda ao solo, momento no qual elas saem do fruto e empupam no substrato, as pupas entre 8 e 14 dias darão origem a moscas jovens que, após a maturação sexual que ocorre em um período de 10 a 15 dias, procurarão parceiros para o acasalamento e recomeçarão o ciclo

(Figura 1). Além da danificação dos frutos devido à alimentação das larvas que se desenvolvem dentro deles, o próprio processo mecânico de oviposição é prejudicial permitindo a invasão de outros organismos como fungos, que danificam a parte carnosa dos frutos (Carvalho 2005), tornando-os impróprios tanto para consumo *in natura* quanto para industrialização.

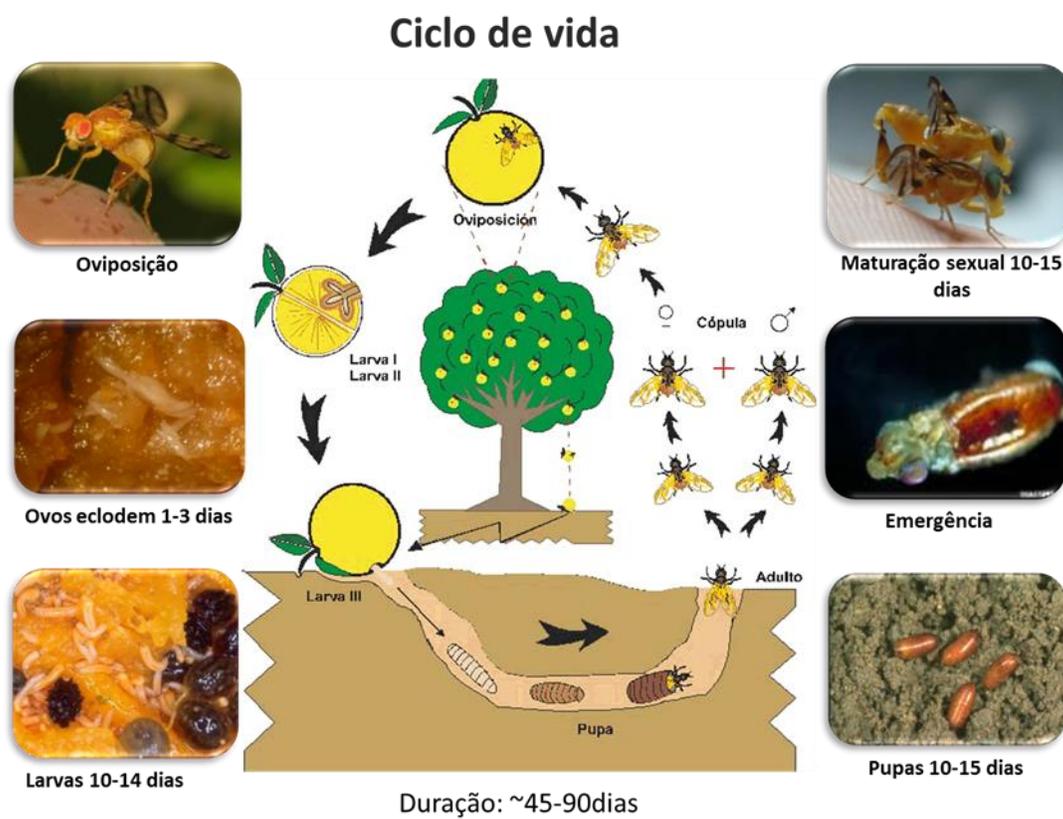


Figura 1. Ciclo de vida de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha*.

Moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* são dos principais grupos de importância econômica no Brasil por causarem grandes prejuízos às lavouras de frutos, o que é agravado pelo fato de estas espécies atacarem frutos verdes e maduros indistintamente (Zucchi 2000). Embora haja certa especificidade, uma vez que a maioria das espécies tem preferência a espécies de uma família de plantas hospedeiras, elas geralmente não são restritas a esta família de hospedeiro, sendo generalistas (Solferini & Morgante 1987). No Brasil, duas das espécies de maior importância são

Anastrepha obliqua (Macquart) e *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann), pertencentes ao grupo *fraterculus*, (Solferini & Morgante 1987) que possuem as mais amplas distribuições geográficas e o maior número de hospedeiros documentados cuja relação já foi registrada (Zucchi 2008). No geral, essas duas espécies exibem preferência por hospedeiros de famílias diferentes: Myrtaceae (goiaba, pitanga, uvaia, feijoa, grumixama) para *A. fraterculus* e Anarcadiaceae (manga, cajá, cajá-mirim, umbu, cajarana, seriguela) para *A. obliqua* (Malavasi *et al.* 2000).

A espécie *A. obliqua*, também chamada de *West Indian fruit fly*, exibe a maior distribuição geográfica, já foi documentada em todos os estados brasileiros com exceção de Sergipe, e já foi registrada utilizando em seu ciclo de vida 47 diferentes hospedeiros (Zucchi 2008). Possui uma alta capacidade de vôo, podendo chegar a 135 km e assim se dispersou rapidamente do sul do México ao sul do Brasil (Fu *et al.* 2014). Dessa forma, Fu e colaboradores (2014) trabalharam com modelagens para prever o potencial de dispersão geográfica desta peste e, diante das atuais condições climáticas e do aquecimento global, o único fator limitante de dispersão desta espécie, o frio, deixa de existir, criando altas possibilidades de *A. obliqua* habitar outras áreas tropicais além das Américas como o sul da Ásia, nordeste da Austrália e África sub-saariana. Isto torna *A. obliqua* um proeminente foco de estudo para controle de pragas.

O Brasil, em 2009, teve uma produção anual superior a 41 milhões de toneladas de frutas (IBRAF, 2009). Nesse ano, a exportação de frutas frescas gerou resultados de aproximadamente 560 milhões de dólares com um volume de mais de 780 mil toneladas. Isso mostra a inexpressividade da inserção do Brasil no mercado internacional, visto que apenas 1,9% da produção de 2009 foram destinadas à exportação. Essa pequena inserção se dá devido ao aumento das exigências dos países importadores de frutos *in natura* por produtos de qualidade, principalmente com relação à presença de resíduos de agrotóxicos (Carvalho *et al.* 2000) e às

barreiras comerciais e fitossanitárias impostas aos frutos brasileiros com o objetivo de impedir a introdução de espécies exóticas de moscas-das-frutas e doenças nos territórios dos países importadores (Duarte & Malavasi 2000), o que não garante a qualidade dos frutos uma vez que não evita o processo de oviposição e às danificações que este causa. Isso obriga os países exportadores a aprimorar as técnicas de cultivo e controle de insetos-praga.

2 – Controle biológico e controle genético

O manejo e controle dessas pragas agrícolas têm sido feito tradicionalmente através de armadilhas tóxicas, pulverização de inseticidas e fumigação (Aluja 1994). Porém, o uso sistemático de agrotóxicos em todas as áreas do agronegócio tem causado inúmeros danos ambientais inaceitáveis. Além da questão ambiental, o uso de pesticidas auxilia no surgimento de pragas cada vez mais resistentes ao princípio ativo utilizado acarretando na aplicação de dosagens cada vez maiores para o controle efetivo das populações; no aumento da probabilidade de surgirem pragas secundárias e diminuição da biodiversidade, uma vez que a utilização desses agentes químicos não se restringe apenas à espécie alvo tendo, portanto, um impacto negativo sobre a entomofauna benéfica (Carvalho *et al.* 2000). Esse quadro contra produtos químicos faz com que a pesquisa científica busque por alternativas viáveis e não agressivas ecologicamente para o controle dessas pragas.

Uma alternativa para o controle de pragas é o controle biológico que visa reduzir a população de insetos-pragas através da inserção no ambiente de seus inimigos naturais, sejam eles parasitas, predadores ou patógenos (DeBach 1964). Vírus, bactérias, fungos, nematóides, predadores e parasitóides podem ser utilizados no controle biológico de moscas-das-frutas (Carvalho *et al.* 2000). Dentre esses organismos, os parasitóides tem se mostrado muito efetivos,

principalmente os braconídeos (Hymenoptera: Braconidae), e são amplamente utilizados em programas de controle e supressão de populações, inclusive de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* (Baranowski *et al.* 1993; Sivinski *et al.* 1996; Montoya *et al.* 2000). Inúmeros estudos associando *Anastrepha* e parasitóides de diversas espécies da família Braconidae são realizados anualmente utilizando como justificativa a utilização desses parasitóides em programas de controle de pragas (Ovruski *et al.* 2011; Cicero *et al.* 2012; Schliserman *et al.* 2013; Núñez-Campero *et al.* 2014; Cancino *et al.* 2014). Porém, talvez seja questionável a supressão de uma espécie praga, como *Anastrepha*, pela inserção de outra espécie, no caso a liberação em massa geração após geração de parasitóides braconídeos, uma vez que estes não parasitam apenas moscas do gênero *Anastrepha*, mas também parasitam outras moscas da ordem Diptera assim como indivíduos das ordens Coleoptera e Lepidoptera, o que poderia causar um grande desequilíbrio no ecossistema.

Outra alternativa muito utilizada para controle de insetos-praga é a Técnica do Inseto Estéril (*Sterile Insect Technique* – SIT) que reduz a população da praga pela liberação em massa de organismos estéreis (Knipling 1955). Este é um tipo de controle genético ou autocida, no qual o inseto é empregado para o seu próprio controle. Além do uso no controle de insetos-praga como, por exemplo, o controle de *Ceratitis capitata* (*Mediterranean fruit fly*) para a qual existem vários estudos sobre programas de controle (Bjelis *et al.* 2006; Schetelig *et al.* 2006; Juan-Blasco *et al.* 2013), essa técnica também é utilizada para o controle de insetos vetores de doenças, como é o caso da mosca tsé-tsé em Zanzibar, África (Vreysen *et al.* 2000). Há também estudos sobre a produção e liberação de machos estéreis em *Anastrepha* como um controle genético das populações naturais (Orozco *et al.* 2004; Allinghi *et al.* 2007; Flores *et al.* 2014).

A esterilização geralmente é feita por radiação ionizante com os radioisótopos ^{60}Co , ^{137}Cs ou equipamentos de raio X, cuja irradiação é feita em única sessão com curto período de tempo.

A utilização de radiação traz muitos efeitos colaterais que diminuem o valor adaptativo dos machos reduzindo sua competitividade com os machos selvagens. Estudos com *C. capitata* observaram alterações na produção de hormônios masculinos (Heath *et al.* 1994), e no comportamento e características de corte e acasalamento (Lux *et al.* 2002; Calcagno *et al.* 2002).

Por este motivo, diferentes estratégias têm sido utilizadas como, por exemplo, a modificação da dieta na qual estes machos são mantidos (Blay & Yuval 1997) ou o uso de aromaterapia, ou seja, a criação dos machos estéreis em ambientes contendo compostos atrativos à fêmea (McInnis *et al.* 2002; Shelly *et al.* 2007). Em *C. capitata* foi demonstrado que a radiação reduz a população de bactérias do sistema digestivo e a inserção dessas bactérias na alimentação dos machos após a irradiação melhora o desempenho destes (Yuval *et al.* 2013). Tais estudos têm produzido resultados diversos (Blay & Yuval 1997; Kaspi & Yuval 2000; Shelly & Kennelly 2002; Shelly & McInnis 2003; Yuval *et al.* 2013) de forma que não temos ainda uma estratégia eficiente de produção de machos estéreis mais ativos e atraentes, o que incentiva as pesquisas nessa área.

3 – Outras estratégias de controle de insetos-praga

O baixo sucesso reprodutivo de machos estéreis gerados por SIT tem estimulado o uso de outras estratégias que envolvam a manipulação de genes e produção de organismos transgênicos. Uma técnica muito utilizada é a RIDL (*“Release of Insects carrying a Dominant Lethal”* ou liberação de insetos carregando um dominante letal) (Thomas *et al.* 2000). Ela consiste na liberação de machos transgênicos que irão copular com fêmeas selvagens, e a prole não é viável. Essa técnica faz uso do ativador de transcrição tetraciclina repressível e, na ausência de tetraciclina, o ativador de transcrição irá expressar o gene controlado por ele, que pode ser um gene dominante letal (Thomas *et al.* 2000). Essa técnica tem sido estudada por diversos grupos de pesquisa como

uma alternativa para o controle genético de populações (Gong *et al.* 2005; Phuc *et al.* 2007; Massonnet-Bruneel *et al.* 2013; Ogaugwu *et al.* 2013; Li *et al.* 2014), inclusive em *Anastrepha* (Schetelig & Handler 2012).

Outra estratégia que tem sido investigada é o uso da manipulação de genes envolvidos na cadeia reprodutiva, como o *dsx*, *tra* e *tra-2* (Saccone *et al.* 2007; Schetelig *et al.* 2012; Jin *et al.* 2013). O mecanismo genético potencialmente ideal para a produção de machos a serem liberados levaria à produção de machos com maior potencial atrativo, mas que seriam estéreis e poderiam inclusive ser nocivos às fêmeas, o que sugere que o estudo de genes sujeitos à seleção sexual possa apresentar um ótimo potencial de investigação, pois diversos destes genes estão envolvidos em processos de reconhecimento sexual e também na geração de isolamento reprodutivo (Andersson & Iwasa 1996; Boake 2000; Panhuis *et al.* 2001; Andres *et al.* 2008).

Embora a seleção sexual seja considerada há tempos um partícipe importante no processo de diferenciação genética e especiação, apenas recentemente seu papel preponderante neste processo foi reconhecido (Snook *et al.* 2009). Além disso, vários genes que são preferencial ou exclusivamente expressos em tecidos reprodutivos, como proteínas do fluido seminal e genes da espermatogênese, passam por pulsos de divergência acelerada em diversas espécies distintas (Haerty *et al.* 2007; Clark *et al.* 2007; Findlay *et al.* 2008; Ramm *et al.* 2008). Da mesma forma, genes envolvidos com a identificação de odores também têm sido relacionados a processos de isolamento reprodutivo e preferências reprodutivas (Vieira *et al.* 2007; Matsuo *et al.* 2007; McBride 2007). A evolução mais rápida das proteínas envolvidas com processos reprodutivos pode levar mais rapidamente ao surgimento de barreiras reprodutivas pré ou pós-zigóticas e, portanto, desencadear ou reforçar o processo de especiação (Martin & Hosken 2003).

Estudos mais detalhados do processo de seleção sexual têm revelado que existe variação nos genes envolvidos que é capaz de aumentar a preferência sexual de fêmeas por portadores de certas variantes, mas que após a reprodução podem levar à redução do valor reprodutivo da fêmea, à inibição de sua libido pós-reprodutivo o que diminui a chance da fêmea se reproduzir com outros machos e pode até mesmo levar à eliminação competitivamente de outros espermatozóides já presentes na espermatogônia da fêmea (Rice 1996; Lew & Rice 2005; Long *et al.* 2010).

Embora a maioria dos dados seja de *Drosophila*, recentemente nossos estudos têm revelado que processos similares podem estar ocorrendo em moscas-das-frutas do grupo *fraterculus*, não apenas com genes expressos em tecidos reprodutivos masculinos (Fernandes 2010), mas também nos femininos (Gonçalves *et al.* 2012) e outros genes envolvidos com a determinação sexual (Sobrinho & de Brito 2010; Sobrinho & de Brito 2012). O melhor entendimento desses processos traz um grande potencial para identificação de genes candidatos para estratégias de SIT, uma vez que tais genes podem estar envolvidos não apenas com a preferência de acasalamento, mas também com o potencial surgimento de barreiras reprodutivas.

4 – A busca por genes candidatos

Para a busca desses genes candidatos, no caso de organismos não-modelo como os pertencentes ao gênero *Anastrepha*, um procedimento bastante útil para a identificação de genes que estão sendo expressos em determinado tecido ou situação é a construção de bibliotecas de cDNA, que são construídas a partir de RNA mensageiros expressos em tecidos, e/ou estágios diferentes do organismo. Dessa forma, essas bibliotecas representam os genes que estão sendo expressos em um organismo ou tecido em determinada fase do ciclo de vida sob determinadas condições ambientais. O surgimento de novas tecnologias como Sequenciamento de Nova

Geração (Next Gen) (Martinez & Nelson 2010) facilitou o processo de obtenção dessas bibliotecas. Plataformas como o Illumina (Bentley *et al.* 2008) podem gerar gigabases de sequências de DNA em curto espaço de tempo e com baixo custo. Além da identificação de novos genes (Swanson *et al.* 2004; Kelleher *et al.* 2007; Thavamanikumar *et al.* 2014), as bibliotecas permitem avaliar níveis de expressão para identificação de genes super ou sub expressos (Kelleher *et al.* 2007; Thavamanikumar *et al.* 2014).

Outro aliado na busca desses genes candidatos através da expressão diferencial que estes apresentam entre determinados tecidos ou condições é a técnica de PCR em tempo real (qPCR). Com esta técnica, é possível a quantificação da amostra através de marcadores fluorescentes adicionados à PCR e um termociclador com sistema óptico para excitação da fluorescência e leitura da emissão em tempo real. qPCR é o mais sensível dos métodos de quantificação possibilitando diferentes contrastes entre as amostras de RNA que pode ser utilizado para caracterizar padrões de expressão em diferentes amostras (Bustin 2000).

Entretanto, a PCR em tempo real é confiável somente quando todas as suas exigências são cumpridas, pois a negligência destas pode levar à interpretação incorreta dos dados de expressão (Bustin & Nolan 2004; Bustin *et al.* 2009). Isso inclui problemas com a qualidade e quantificação das amostras depois da extração do RNA total, a eficiência da reação de conversão de RNA para cDNA por transcrição reversa, variabilidade entre operadores, erros aleatórios de pipetagem e a subjetividade da análise dos dados devido às dificuldades com a sua normalização, entre outros fatores que podem criar variação entre amostras e entre reações (Bustin 2010; Taylor *et al.* 2010). A utilização de bons genes de referência resolve o problema da normalização dos dados, pois atuam como um padrão interno de expressão para assim ser calculado um valor de expressão relativa normalizada. Estes genes de referência precisam ter a expressão uniforme entre os

diferentes tecidos ou condições experimentais estudados para assim possibilitar confiável normalização e comparação dos dados, e precisam ser corretamente validados para essas condições para prevenir erros de interpretação dos dados de expressão (Huggett *et al.* 2005). Dessa forma, tomando as devidas precauções, a técnica de qPCR torna-se grande aliada na busca por genes candidatos a estarem participando do processo reprodutivo mediante diferenças na expressão entre os perfis relacionados.

Este estudo focou nos perfis de tecidos reprodutivos e cabeça e seus genes diferencialmente expressos não apenas por seu potencial para melhor elucidar processos evolutivos entre espécies que divergiram há pouco tempo, mas também porque esses tecidos têm potencial de revelar genes que participam do processo reprodutivo e que também estejam sujeitos à seleção sexual. O tecido reprodutivo por si só indica a presença de genes que participam da reprodução e a cabeça, por ser centro do sistema nervoso, coordena muitas funções, inclusive as reprodutivas, além de possuir importantes órgãos sensoriais, como as antenas, que atuam no reconhecimento de parceiros para o acasalamento e na busca de sítios para oviposição

5 – RNA de interferência: maquinaria de silenciamento gênico na elucidação de funções gênicas

No entanto, diferencial de expressão não é o suficiente para se assegurar o envolvimento de genes candidatos em determinadas funções. Estudos funcionais podem auxiliar na averiguação sobre o real envolvimento de genes candidatos no processo reprodutivo através do silenciamento de genes e relacionar essa supressão de expressão com o fenótipo obtido. Este silenciamento pode ser feito mediante interferência por RNA. RNA de interferência (RNAi) foi inicialmente descoberto em estudos com *Caenorhabditis elegans* e trata-se de um mecanismo de silenciamento

gênico pós-transcricional (Fire *et al.* 1998). Posteriormente, foi reconhecido como um mecanismo antiviral para a proteção do organismo contra RNA oriundo de vírus (Waterhouse *et al.* 2001).

Esta técnica está entre as mais poderosas estratégias de estudos de função gênica. Todo o processo é desencadeado por moléculas de RNA dupla-fita (dsRNA) que são processadas em moléculas menores como pequenos RNA (siRNA) e microRNAs (miRNA), que guiam a degradação do RNA mensageiro (mRNA), modificação da cromatina e modulando processos de transposição (Hammond *et al.* 2000; Meister & Tuschl 2004). O processo de silenciamento só ficou bem elucidado após a descoberta que genes específicos em plantas e animais codificam formas de dsRNA com sequências auto-complementares, formando grampos (Bartel 2004) e são essas sequências que pareiam com o mRNA causando a sua degradação antes que seja traduzido em proteína.

Para entender melhor como ocorre o processo de silenciamento e seus componentes (Hammond *et al.* 2000; Hammond *et al.* 2001; Hamilton *et al.* 2002; Tomoyasu *et al.* 2008), basicamente um longo dsRNA, após entrar na célula, é quebrado em pequenos RNAs de interferência (siRNAs) em torno de 21 pb por uma RNase-III dsRNA-específico chamada Dicer. Os siRNAs são então acoplados no complexo de indução de silenciamento RISC (*RNA Induced Silencing Complex*) por proteínas de ligação ao dsRNA, chamadas de dsRBM (*dsRNA-binding motif proteins*). Uma das proteínas que compõe RISC é a enzima RNase H *Argonaute* (*Ago*) que reconhece o mRNA alvo por meio da complementariedade de sequência e cliva o mRNA levando a sua degradação.

Visto todo processo de silenciamento guiado por moléculas de RNA e que esta maquinaria é conservada em diferentes organismos eucarióticos (Hannon 2002; McManus & Sharp 2002;

Baulcombe 2004; Huvenne & Smagghe 2010), a introdução artificial de dsRNA é uma ferramenta que está sendo muito utilizada para a inativação da expressão gênica tanto em culturas de células quanto em organismos. Integrado às técnicas de controle genético apresentadas anteriormente, como SIT e criação de organismos transgênicos, RNAi tem sido utilizado em muitos estudos que visam empregar o controle genético em pragas agrícolas como *Tribolium castaneum* (Noh *et al.* 2012), afídeo-da-ervilha (Mutti *et al.* 2006) e moscas-das-frutas da família Tephritidae (Scolari *et al.* 2008; Price & Gatehouse 2008) como *Bactrocera* (Raphael *et al.* 2004; Li *et al.* 2011b), *Ceratitis* (Saccone *et al.* 2007) e *Anastrepha* (Schetelig *et al.* 2012).

OBJETIVOS

Este trabalho tem finalidade identificar genes potencialmente envolvidos no processo reprodutivo de *A. obliqua*.

Objetivos específicos

1 – A partir dos dados dos transcriptomas de tecidos reprodutivos e de cabeça de machos de *A. fraterculus* previamente gerados em nosso laboratório para os perfis virgem e pós-cópula, selecionar genes diferencialmente expressos entre esses perfis que sejam potencialmente envolvidos com o processo reprodutivo em *Anastrepha*.

2 – Padronizar a técnica de PCR em tempo real no Laboratório de Genética de Populações e Evolução, bem como validar genes de referência apropriados para a normalização dos dados de expressão entre fases do ciclo de vida de *A. obliqua*.

3 – Determinar o padrão de expressão por qPCR dos genes candidatos retirados dos transcriptomas em fases específicas do ciclo de vida como larva, pupa, adulto virgem e adulto pós-cópula para machos e fêmeas em *A. obliqua* como método de selecionar os genes de interesse.

4 – Promover o silenciamento por interferência por RNA (RNAi) de dois genes candidatos e iniciar a padronização dessa técnica para sua aplicação em moscas adultas do gênero *Anastrepha*.

MATERIAL E MÉTODOS

1 – Criação das moscas

O Laboratório de Genética de Populações e Evolução da Universidade Federal de São Carlos mantém, em seu insetário, populações de diferentes espécies de moscas-das-frutas *Anastrepha* de várias localidades do território brasileiro. As moscas são mantidas em caixas de acrílico, criteriosamente identificadas, contendo água e alimento à base de proteína para moscas adultas, em sala climatizada a $28^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ e em condições naturais de fotoperíodo. Para manutenção dessas populações, após a emergência dos adultos, montamos cruzamentos contendo de 10 a 20 casais e, após uma semana, tempo para ocorrer a maturação sexual e cópulas, oferecemos mangas (tratadas com solução 2% do fungicida Nipagin) a todas as populações para oviposição. Após uma semana, retiramos os frutos dessas caixas de cruzamento e colocamos em caixas acrílicas contendo vermiculita, onde as larvas terminarão seu desenvolvimento no fruto, tornando-se pupas sobre o substrato. Essa vermiculita é peneirada semanalmente até que todas as pupas sejam retiradas e acondicionadas em novas caixas contendo água e alimento, caixas berçários, onde os adultos jovens irão emergir para recomeçar o ciclo. Para este trabalho, utilizamos uma linhagem de *Anastrepha obliqua* proveniente de Goiânia, Goiás, Brasil, coletadas a partir de seriguela em e uma linhagem de *Anastrepha fraterculus*, originada da coleta do fruto pitanguinha do cerrado proveniente da região de São Carlos, São Paulo, Brasil.

2 – Geração dos transcriptomas

Como em nosso laboratório há o interesse na identificação de genes envolvidos com processos reprodutivos, foram sequenciados os transcriptomas de cabeça e tecido reprodutivo de *A. fraterculus* de acordo com (Rezende, V.B.; Congrains, C.C.; Lima, A.L.A.; Campanini, E.B.;

Nakamura, A.M.; Oliveira, J.L.; Chahad-Ehlers, S.; Sobrinho Jr, I.; de Brito, R.A.; dados não publicados). Para tal, *pools* distintos de cabeça e tecido reprodutivo foram montados para os seguintes perfis: fêmeas virgens, fêmeas 24 horas pós-cópula, machos virgens, machos 24 horas pós-cópula e fêmeas pós-oviposição. Após preparação das amostras, os *pools* de RNA total foram enviados ao Laboratório de Biotecnologia Animal, Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) para a construção de bibliotecas 100pb paired-end usando o *TruSeq RNA Sample Prep Kit*, sequenciadas em um equipamento *Illumina HiSeq* (Bentley *et al.* 2008). Todos os procedimentos de bioinformática como filtração dos *reads* por qualidade, montagem dos *contigs*, anotação e análises de expressão diferencial foram conduzidos nos servidores presentes em nosso laboratório.

3 – Escolha dos genes e obtenção dos fragmentos

3.1 – Escolha dos genes e desenho de *primers*

Para a escolha dos genes alvo, utilizamos como critério os resultados gerados das análises de expressão diferencial feitas entre os dados de transcriptomas de machos virgens e machos pós-cópula de *A. fraterculus*, partindo do pressuposto que estes estão potencialmente envolvidos na reprodução. Uma vez selecionados 14 *contigs*, buscamos em bancos de dados públicos (NCBI e Flybase) ortólogos de espécies filogeneticamente próximas, incluindo outros tefritídeos como *Ceratitidis capitata*, e algumas espécies da família Drosophilidae. As sequências foram alinhadas no programa ClustalX (Jeanmougin *et al.* 1998), implementado no BioEdit (Hall 1999), o que permitiu que desenhassemos *primers* nas extremidades dos *contigs*. Verificamos diversos parâmetros indicadores da qualidade destes *primers* como a estabilidade de estruturas secundárias, grampos e alças no programa *OligoAnalyzer3.0*

(<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx/oligocalc.asp>), o que nos auxiliou a reduzir a produção de artefatos e aumentar a eficiência das reações de amplificação. Estes primers foram sintetizados com a finalidade de amplificar o DNA de *A. obliqua* no intuito de corroborar as sequências obtidas no Illumina e também revelar possíveis *introns* na região codificadora.

3.2 – Amplificação dos fragmentos por PCR

Para estipular as condições ótimas de amplificação, prosseguimos com testes de temperatura, totalizando cinco temperaturas: a temperatura calculada de hibridação dos *primers*, duas acima e duas abaixo desta temperatura. Além disso, fizemos testes de concentração de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) (1,0mM, 1,5mM e 2,5mM) e quando necessário, dobramos a concentração dos *primers* de 0,2mM para 0,4mM. O tampão utilizado foi o tampão 10X com KCl comercializado com a *Taq DNA Polymerase* (Thermo Scientific). Os demais reagentes foram utilizados nas seguintes concentrações: albumina de soro bovino (BSA) a 0,05 μ g/ μ l, dNTPs (Thermo Scientific) a 0,2mM, 0,25u de *Taq DNA Polymerase* (Thermo Scientific) em reações com volume total de 20 μ l. Após a determinação das melhores condições de amplificação, prosseguimos com reações para obtenção do material para clonagem, com volume total de 25 μ l e tempo de extensão final de 20 minutos, o que aumenta a probabilidade da *Taq DNA* polimerase adicionar uma deoxiadenosina trifosfato (dATP) na extremidade 3' de cada produto de PCR. Isso cria uma saliência (*overhang*) 3'- dA que é complementar à saliência 3' com timidina trifostato (dTTP) presente no vetor, o que aumenta a eficiência da clonagem.

3.3 – Purificação por precipitação com polietilenoglicol

Após amplificação, realizamos a purificação dos produtos de PCR utilizando PEG 8000 (Polietilenoglicol 8000) (Lis & Schleif 1975). A concentração da solução que utilizamos, PEG8000 20% e NaCl 2,5 M, foi padronizada para precipitar produtos com mais de 200 pares de bases (pb) o que permite precipitar o produto amplificado e eliminar artefatos como dímeros de *primers* e nucleotídeos não incorporados. Adicionamos um volume de solução de PEG igual ao volume de amostra e homogenizamos imediatamente. Incubamos em banho seco a 37°C por 15 minutos. Centrifugamos a 16.000 x g por 15 minutos e descartamos o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta. Adicionamos 125 µl de etanol 80% gelado para iniciar a lavagem do *pellet* e centrifugamos a 16.000 x g por 2 minutos, descartando o etanol logo em seguida. Fizemos essa lavagem com etanol 80% duas vezes e secamos o material a 50°C. Ressuspendemos o precipitado em 20 µl de água ultrapura e 1,0 µl foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para verificarmos a eficiência da purificação e quantificarmos a amostra através do auxílio de marcador de peso molecular *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* (Thermo Scientific).

3.4 – Clonagem

Com o produto purificado e quantificado, fizemos reações de ligação com plasmídeos pGEM-T presente no kit de clonagem *pGEM-T Vector System I* (Promega) e transformamos bactérias *Escherichia coli* da cepa DH5α quimicamente competentes. Utilizamos a proporção 3:1 na relação massa da amostra e massa do vetor. Realizamos a transformação acrescentando 20 µl das bactérias competentes em 5,0 µl de reação de ligação. Incubamos os tubos em gelo por 30 minutos e depois em banho-maria a 42°C por 2 minutos e novamente em gelo por 5 minutos. Adicionamos aos tubos 500 µl de meio LB líquido e deixamos as bactérias crescerem por 1 hora

em banho-maria a 37 °C. Centrifugamos os tubos a 9.000 x g por 2 minutos, retiramos 400 µl de sobrenadante e homogeneizamos os 100 µl restantes, os quais foram inoculados em duas placas de *Petri* contendo meio de cultura LB sólido seletivo (com adição de ampicilina - concentração: 0,1 µg/µl). Para crescimento das colônias, incubamos as placas a 37°C por 18 horas.

Amostramos quatro colônias por placa, totalizando em oito colônias por gene, e avaliamos a presença do inserto nas colônias recombinantes por PCR direta de colônia (Dallas-Yang *et al.* 1998) utilizando os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse*, que amplificam regiões flanqueadoras à região do inserto no vetor do clone. Para realizarmos esta reação de amplificação colocamos as colônias em 20 µl de água ultrapura por 5 minutos a 90°C para lise das células e liberação dos plasmídeos e, posteriormente, fizemos a PCR direta de colônia. Purificamos as amostras positivas para o inserto novamente através de precipitação diferencial com PEG8000 (20% PEG8000 e 2,5 M NaCl) (Lis & Schleif 1975), como descrito no item 3.3 “Purificação por precipitação com polietilenoglicol” e as ressuspendemos em 20 µl de água ultrapura. Quantificamos em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo utilizando marcador de peso molecular *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* (Thermo Scientific).

3.5 – Sequenciamento

Selecionamos os produtos purificados de duas colônias de cada gene que apresentaram quantificação igual a 50 ng/µl e enviamos para uma empresa especializada (MACROGEN INC., Coréia do Sul) que realizou o seu sequenciamento. Utilizamos o programa ChromasPro 2.31 (<http://en.bio-soft.net/dna/chromas.html>) para visualização da qualidade dos eletroferogramas.

O alinhamento dos produtos sequenciados com espécies filogeneticamente próximas permitiu confirmar as sequências, bem como revelar regiões propícias para o desenho de *primers*

para a qPCR. Porém, antes de começar esta etapa, como a técnica de qPCR nunca havia sido utilizada em nosso laboratório e nem tampouco na espécie por nós estudada, era essencial que fizéssemos a padronização da técnica e validação de genes de referência que serão utilizados na normalização dos dados.

4 – Investigação e padronização dos genes de referência para PCR quantitativa em tempo real (qPCR) em *A. obliqua*

4.1 – Amostragem

A partir deste ponto do trabalho, passamos a utilizar a população de *A. obliqua* descrita no item 1 “Criação das moscas”. Escolhemos os genes, tanto para os estudos de expressão quanto os candidatos a gene de referência para qPCR, com base nos dados de transcriptomas de *A. fraterculus* por esses serem os primeiros e únicos resultados de sequenciamento de próxima geração que estavam disponíveis até aquela etapa. No entanto, dados de transcriptomas de *A. obliqua* para os mesmos contrastes foram gerados posteriormente ao início do projeto, possibilitando nosso estudo também em *A. obliqua*. As próximas etapas do trabalho que envolveram estudos de expressão ao longo das fases do desenvolvimento de *Anastrepha* foram feitas com moscas inteiras, e não dissecadas por tecido, portanto, separamos indivíduos não dissecados para a padronização. Isso porque na técnica de silenciamento via interferência por RNA, que utilizamos posteriormente na continuidade deste trabalho, não seria possível aplicá-la em tecidos específicos. Fizemos três réplicas biológicas para cada perfil analisado, sendo eles larvas de segundo instar, larvas de terceiro instar, pupas de primeiro estágio, pupas de segundo estágio, machos virgens sexualmente maduros, fêmeas virgens sexualmente maduras, machos 24 horas pós-cópula e fêmeas 24 horas pós-cópula. Compusemos cada réplica de cada perfil com um *pool* de cinco indivíduos distintos.

4.2 – Extração de RNA total

Fizemos a extração de RNA utilizando o protocolo de fenol/clorofórmio (Chomczynski & Sacchi 1987), adaptado para cada fase de vida. Fizemos estas adaptações na primeira etapa da extração que é a maceração dos tecidos. As larvas de segundo instar foram maceradas em *pool* contendo os cinco indivíduos, já as larvas de terceiro instar e as pupas foram maceradas individualmente. Fizemos a maceração por pouco tempo (3 segundos) por estes perfis conterem muita gordura, o que atrapalha as próximas etapas da extração. Os demais indivíduos referentes às fases adultas foram macerados individualmente por 15 segundos. Lavamos todos os indivíduos em água *UltraPure™ DEPC-treated water* (Invitrogen™) e estabilizador *RNAholder* (BioAgency) antes da maceração.

Após a maceração do material em 50 µl de *RNAholder* (BioAgency) e 50 µl de solução de *TRIzol® Reagent* (Life Technologies™) com 0,7% de β-mercaptoetanol, adicionamos mais 200 µl desta solução, maceramos por mais 5 segundos, e completamos a solução de fenol com β-mercaptoetanol (0,7%) para 1 ml. Homogeneizamos em agitador elétrico (vórtex) por 20 segundos e incubamos no gelo por 10 minutos. Após centrifugação a 4°C e 10.000 x g por 2 minutos, retiramos o sobrenadante e transferimos a um novo tubo onde adicionamos 300 µl de clorofórmio com álcool isoamílico na proporção 21:1. Homogeneizamos rapidamente em vórtex e centrifugamos a 4°C e 10.000 x g por 15 minutos. Transferimos a fase aquosa (superior) para um novo tubo e repetimos esse procedimento com clorofórmio e álcool isoamílico. Para precipitação do RNA total adicionamos isopropanol 100% na proporção 1:1 (1 de isopropanol: 1 de amostra), invertemos os tubos 10 vezes e incubamos do gelo por 10 minutos. Após centrifugação a 4°C e 12.000 x g por 10 minutos, descartamos o sobrenadante e lavamos o material precipitado (*pellet*) com três lavagens com etanol 80% (500 µl de etanol 80% seguido de centrifugação a 4°C e 7.500

x g por 5 minutos). Após a retirada do etanol, deixamos o material precipitado secar a 60°C e o ressuspendemos em 30 µl de água *UltraPure™ DEPC-treated water* (Invitrogen™) pré-aquecida a 60°C.

4.3 – Purificação por precipitação com cloreto de lítio

O isolamento de RNA total pelo protocolo de fenol-clorofórmio comumente deixa sinais de contaminação por fenol além de demais contaminantes provenientes das amostras como DNA, carboidratos e proteínas o que pode causar inibição das enzimas transcriptase reversa e DNA polimerase utilizadas em etapas subsequentes. As vantagens do uso do Cloreto de Lítio (LiCl) na precipitação é que ele precipita de maneira eficiente o RNA, mas não DNA, carboidratos e proteínas (Barlow *et al.* 1963).

Utilizamos uma solução de LiCl à 7,5 M e adicionamos às amostras de RNA total até atingir a concentração final de 2,5 M. Congelamos as amostras à -20°C por 30 minutos e posteriormente centrifugamos a 4°C e 13.000 x g por 15 minutos. Descartamos o sobrenadante e lavamos o material precipitado com 1,0 ml de etanol 70% gelado. Passamos as amostras rapidamente em vórtex e centrifugamos a 4°C e 13.000 x g por 15 minutos. Após deixar o *pellet* secar a 60°C, o ressuspendemos em 35 µl de água *UltraPure™ DEPC-treated water* (Invitrogen™). Do volume total (35 µl) fizemos alíquotas de 5,0 µl para cada amostra que foram utilizadas na quantificação e conferência da qualidade do RNA total, os 30 µl restantes foram armazenados a -80°C até sua utilização.

Quantificamos e visualizamos a qualidade das amostras de RNA total em gel de agarose 1%, quantificamos em fluorômetro *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen™) com o kit *Qubit™ RNA BR* (Invitrogen™), seguindo as especificações do fabricante, e utilizamos um espectrofotômetro

NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Helthcare) para verificar a qualidade e a presença de contaminantes como fenol.

4.4 – Produção de cDNA

Fizemos um *pool* com todos os indivíduos coletados para cada perfil totalizando oito *pools* e tratamos o RNA com desoxiribonuclease *DNase I Amplification grade* (Invitrogen™) para garantir a não contaminação com DNA o que poderia resultar em falsos valores de expressão. Posteriormente, de cada *pool* foi retirado 1,0 µg de RNA total para a produção de cDNA, por transcrição reversa, utilizando o kit *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad). Diluímos este cDNA a uma concentração final de 4,0 ng/µl para utilização nos experimentos.

4.5 – Escolha dos genes candidatos à referência para qPCR e desenho dos *primers*

Escolhemos oito genes constitutivos, cuja maioria já havia sido investigada como genes de referência para qPCR em insetos como *Bombus terrestris* (Hymenoptera), *Rhodnius prolixus* (Hemiptera), *Bactrocera dorsalis* (Diptera), *Lucilia cuprina* (Diptera) and *Cimex lectularius* (Hemiptera) (Bagnall & Kotze, 2010; Hornáková *et al.*, 2010; Ling & Salvaterra, 2011; Majerowicz *et al.*, 2011; Mamidala *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2010). Dentre os genes constitutivos estão *Actin (Act)*, *β-Tubulin (btub)*, *Elongation factor 1α (eF1α)*, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh)*, *Ribosomal protein L18 (rpl18)*, *Ribosomal protein S17 (rps17)*, *Syntaxin (syn)* e *Troponin C (TpnC)*. Pegamos as seguintes sequências referentes a estes genes de *D. melanogaster* na base de dados do *GenBank*: *rpl18* (NM_139834.2), *btub* (EU980443.1), *ef1a* (GU339154.1), *rps17* (NM_079278.2), *gapdh* (GU269901.1), *syn* (NM_168905.1), *tpnC* (EZ423429.1) and *act* (L12254.1); e as utilizamos em uma procura por BLAST nos dados de transcriptoma de *A. fraterculus* (Rezende, VB; Castillo, CC; Lima, AL; Campanini, EB;

Nakamura, AM; Oliveira, JL; Chahad-Ehlers, S; Sobrinho-Jr., I; de Brito, RA; dados não publicados). Alinhamos as sequências obtidas dos dados de transcriptoma de *A. fraterculus* com as sequências de *D. melanogaster* utilizando o programa MAFFT (Kato & Standley, 2013) e desenhamos os *primers* em regiões conservadas dos genes.

4.6 – qPCR

Para todas as amplificações por qPCR utilizamos o kit *SsoFast™ Evagreen® Supermix* (Bio-Rad) com uma concentração dos *primers* igual a 0,3 μ M em um volume final de reação de 10 μ l, que foram conduzidas em termociclador *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems* (Bio-Rad). O protocolo de corrida para todas as reações foi: 95°C por 30 segundos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos e hibridização dos *primers* mais extensão a 60°C por 1 minuto; para as análises de curva de *melting*, leituras constantes de fluorescência foram feitas de 65°C a 95°C, com aumento de 0,5°C por 5 segundos. Utilizamos controles negativos de reação, *no-template control* (NTC), com réplica em todas as amplificações por qPCR, para assegurar que não há contaminação com qualquer tipo de material exógeno às amostras testadas.

4.6.1 – Teste de eficiência de reação

Antes de utilizar qualquer *primer* em qPCR, é necessário saber se a reação é eficiente tanto em baixas quanto em altas concentrações, de tal modo que a eficiência do *primer* não pode variar devido a variações nas concentrações de cDNA das amostras. A utilização de *primers* que conduzem a reações que apresentam valores de eficiência fora do aceitável, entre 95% e 105% (Bustin *et al.* 2009), pode levar a interpretações erradas dos níveis de expressão. Dessa forma, calculamos a eficiência (E) e o coeficiente de correlação (R^2) para cada par de *primer* através de uma curva padrão de correlação entre as concentrações de cDNA e os valores de C_q (*quantitative*

cycle) (Pfaffl 2001; Vandesompele *et al.* 2002). Para isso, fizemos um *pool* geral de cDNA com quantidades iguais de cada *pool* de cada perfil, com concentração inicial de 4,0 ng/μl, e fizemos uma diluição seriada (7x) de base 4, gerando as seguintes concentrações: 1,0 ng/μl, $2,5 \times 10^{-1}$ ng/μl, $6,25 \times 10^{-2}$ ng/μl, $1,56 \times 10^{-2}$ ng/μl, $3,91 \times 10^{-3}$ ng/μl, $9,77 \times 10^{-4}$ ng/μl e $2,44 \times 10^{-4}$ ng/μl. Conduzimos as reações para cada diluição para cada gene candidato em triplicata.

4.6.2 – Teste de uniformidade de expressão

Para ser utilizado como referência em estudos de expressão por qPCR, um gene deve ter sua expressão constante e uniforme em todas as condições experimentais testadas. Para tanto, para checar a uniformidade de expressão de cada candidato a gene de referência ao longo das fases do desenvolvimento de *A. obliqua*, fizemos reações em triplicata para cada amostra de cada réplica biológica com concentração inicial de 4,0 ng/μl.

4.7 – Análises de estabilidade gênica

Visualizamos os resultados de qPCR e geramos as curvas padrões no programa *Bio-Rad CFX ManagerTM* (Bio-Rad). Para as análises de estabilidade gênica, utilizamos o programa *RefFinder* (Ovesná *et al.* 2012; Chao *et al.* 2012a; Chao *et al.* 2012b; Jacob *et al.* 2013; Cheng *et al.* 2013; Wang *et al.* 2013), disponibilizado pelo *Cotton EST Database* (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>), que produz um ranque com todos os candidatos a gene de referência baseado nos principais algoritmos utilizados atualmente para este tipo de análise: *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002), *Normfinder* (Andersen *et al.*, 2004), *BestKeeper* (Pfaffl *et al.*, 2004) e método comparativo ΔCt (Silver *et al.*, 2006).

Cada algoritmo usa de diferentes recursos para o cálculo da estabilidade gênica. O *geNorm* calcula um fator de normalização (M), baseado na média geométrica dos genes candidatos,

descrevendo a variação média de um candidato em relação a todos os outros sendo que menores valores de M indicam menor variação da expressão, ou seja, melhor estabilidade. Assim, esse programa promove uma ligação entre genes, indicando o melhor par (mais estável), ou o melhor conjunto de genes que juntos apresentam uma menor variação de expressão. Dessa forma, *GeNorm* não só calcula a estabilidade de cada gene separadamente, mas também determina o número ótimo de genes de referência a ser utilizado em dadas condições experimentais (Vandesompele *et al.*, 2002). *NormFinder* utiliza um modelo matemático para estimar a variação de expressão global dos genes candidatos a gene de referência e a variação entre subgrupos de amostras do conjunto de amostras (exemplo: grupo controle contra o grupo tratado) (Andersen *et al.* 2004). O programa *BestKeeper* correlaciona os valores de expressão de todos os genes candidatos, analisando a estabilidade através de três indicadores: desvio padrão, covariância e análise de correlação de *Pearson* (Pfaffl *et al.* 2004). O método comparativo ΔCt indica os genes mais estáveis comparando a expressão relativa dos genes par-a-par para cada amostra. Se os valores de ΔCt entre dois candidatos se mantêm constante entre diferentes amostras, significa que apresentam estabilidade de expressão, entretanto, se os valores de ΔCt mudam, que pelo menos um dos genes da comparação apresenta variação na expressão (Silver *et al.* 2006).

Devido às diferenças de cada método em analisar os valores de expressão dos genes candidatos, cada programa gera diferentes classificações para os genes analisados. Como o programa RefFinder utiliza os resultados de cada um desses quatro diferentes programas, ele permite a escolha do melhor gene candidato ou conjunto de genes para o desenho experimental proposto.

5 – Quantificação relativa da expressão dos genes candidatos por qPCR em *A. obliqua*

5.1 – Desenho dos *primers* de qPCR

A partir desta etapa, fizemos uma nova seleção dentre os genes candidatos inicialmente selecionados para seguir com as análises de expressão. Escolhemos cinco genes cujo sequenciamento obtivemos nas etapas anteriores (item 3 – escolha dos genes e obtenção dos fragmentos), sendo eles *Jonah 65Aiv* (*Jon65Aiv*), *Odorant-binding Protein 56a* (*Obp56a*), semelhante à *CG14645* de *D. melanogaster*, *Odorant-binding protein 99c* (*Obp99c*) e *Odorant-binding protein 19d* (*Obp19d*) e quatro genes, *Attacin-A* (*AttA*), semelhante à *CG11912* de *D. melanogaster*, semelhante à *CG30025* de *D. melanogaster* e *θTrypsin* (*θTry*), para os quais tínhamos apenas as sequências geradas pelos transcriptomas. Dessa maneira, para cada gene utilizamos de, quando disponível, sequências obtidas no sequenciamento, sequências obtidas dos transcriptomas, as mesmas utilizadas na etapa descrita no item 3.1 “Escolha dos genes e desenho de *primers*” e sequências de espécies filogeneticamente próximas como *C. capitata* e *D. melanogaster*. Utilizamos o programa ClustalX (Jeanmougin *et al.* 1998) implementado no BioEdit (Hall 1999) para fazer os alinhamentos. A partir desta etapa, os procedimentos para os genes *AttA*, *Obp56a* e *θTry* foram feitos pela aluna de Iniciação Científica Cristiane Hayumi Taniguti, como parte de seu trabalho de conclusão de curso.

Para todos os genes, e tendo o conhecimento prévio de que a técnica de qPCR é bem exigente quanto às condições de amplificação, a fim de se evitar dados que revelam informações erradas sobre a expressão em determinada condição experimental, desenhamos os pares de *primers* de maneira criteriosa, em regiões conservadas. Para os genes que possuem *introns*, *Obp99c*, *Obp19d* e *Jon65Aiv*, não foi possível o desenho de *primers* na região entre *exons*, no entanto,

desenhamos os primers em *exons* diferentes, quando possível, a fim de evitar a amplificação de possível DNA contaminante (Anexos 7 e 8). Verificamos diversos parâmetros indicadores da qualidade destes *primers* como a estabilidade de estruturas secundárias, para nos auxiliar a reduzir a produção de artefatos e melhorar a eficiência das reações, no programa *OligoAnalyzer3.0* (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx/oligocalc.asp>).

5.2 – Expressão dos genes candidatos nos diferentes perfis

Realizamos os procedimentos para a quantificação relativa da expressão dos genes candidatos ao longo do ciclo de vida de *A. obliqua* por qPCR com as mesmas amostras resultantes da amostragem descrita nos itens 4.1 “amostragem” e 4.2 “Extração de RNA total” totalizando três réplicas biológicas de oito *pools* referentes a oito perfis do ciclo de desenvolvimento de *Anastrepha*: larvas de segundo instar, larvas de terceiro instar, pupas de primeiro estágio, pupas de segundo estágio, machos virgens sexualmente maduros, fêmeas virgens sexualmente maduras, machos 24 horas pós-cópula e fêmeas 24 horas pós-cópula.

Seguimos com as amplificações por qPCR utilizando as mesmas condições e protocolo de amplificação descritos no item 4.6 “qPCR”. Aferimos a eficiência das reações conduzidas por todos os pares de *primers* desenhados por meio de curva padrão como descrito no item 4.6.1 “Teste de eficiência de reação”. Todas as diluições foram amplificadas em triplicata e utilizamos o NTC em duplicata. Posteriormente, conduzimos as reações para aferirmos a expressão dos genes ao longo dos oito perfis em triplicata para cada amostra com concentração igual a 4,0 ng/μl, e em duplicata para o NTC referente à reação de cada par de *primer*. Para a quantificação da expressão normalizada utilizamos como gene de referência os genes *rpl18*, *rps17* e *ef1a* que padronizamos como descrito no item 4 “Investigação e padronização dos genes de referência para PCR

quantitativa em tempo real (qPCR) em *A. obliqua*”, mostrando-se adequados para o desenho experimental aqui proposto.

Visualizamos os resultados de qPCR no programa *Bio-Rad CFX ManagerTM* (Bio-Rad) e o utilizamos para o cálculo da expressão normalizada relativa de cada gene pelo método do $\Delta\Delta C_q$ ou método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ (Livak & Schmittgen 2001), que calcula a diferença entre os valores de C_q do gene alvo e do gene de referência (ΔC_q) e depois os valores de ΔC_q das amostras são comparados ($\Delta\Delta C_q$). Como foi necessária a normalização dos dados com mais de um gene de referência, o programa *Bio-Rad CFX ManagerTM* (Bio-Rad) é indicado por ser capaz de lidar com múltiplos genes de referência (Vandesompele *et al.* 2002). Além disso, utilizamos de calibradores entre placas, que se trata de pelo menos uma mesma amostra que se repete em todas as placas, a fim de se normalizar as variações entre corridas devido à necessidade do uso de mais de uma placa para completar os estudos de expressão gênica.

6 – RNA de interferência

6.1 – Produção *in vitro* de dsRNA

A partir dos resultados obtidos no item 5 “Quantificação relativa da expressão dos genes candidatos por qPCR em *A. obliqua*”, selecionamos os genes semelhantes a *Obp99c* e *Atta* para a produção de dsRNA para tentativas de silenciamento via interferência por RNA em *A. obliqua*. Experimentos de silenciamento exigem dois tipos de grupo controle, um grupo tratado com injeções de dsRNA de um gene exógeno ao organismo estudado e sem nenhuma similaridade com seus genes endógenos, e um grupo sem tratamento. O grupo controle tratado com dsRNA de um gene exógeno tem como função confirmar se os efeitos observados na expressão e fenótipo são decorrentes do silenciamento do gene alvo ou de efeitos decorrentes do próprio processo de injeção

e inserção de fragmentos de dsRNA. Dessa forma, escolhemos um fragmento do plasmídeo pTZ57R/T para ser injetado no grupo controle com tratamento, que não apresentou nenhuma similaridade com nossos dados de transcriptoma.

6.1.1 – Desenho dos *primers*

Para a produção de dsRNA é preciso, como primeiro passo, isolar o fragmento do RNA mensageiro do gene que se deseja silenciar por meio de PCR. Para selecionarmos estes fragmentos, fizemos um alinhamento para cada gene com base nos transcritos retirados de todos os dados de transcriptomas que, nesta etapa do trabalho, já estavam bem consolidados, sendo eles cabeça e tecido reprodutivo de machos tanto para *A. fraterculus* quanto para *A. obliqua* (Rezende, V.B.; Congrains, C.C.; Lima, A.L.A.; Campanini, E.B.; Nakamura, A.M.; Oliveira, J.L.; Chahad-Ehlers, S.; Sobrinho Jr, I.; de Brito, R.A.; dados não publicados). Assim, utilizamos os primeiros transcritos selecionados e utilizados nos itens 3.1 “Escolha dos genes e desenho de *primers*” e 5.1 “Desenho dos *primers* de qPCR”, para selecionar os transcritos presentes nos transcriptomas via BLAST. Depois, utilizamos o CAP3 (Huang & Madan 1999) para geração de sequências consenso e alinhamos utilizando o programa MAFFT (Katoh & Standley, 2013). Alinhamos as sequências consenso aos transcritos utilizados no desenho dos *primers* das etapas anteriores e às sequências de *C. capitata* correspondentes aos genes candidatos. Por meio do alinhamento, procuramos as regiões mais conservadas entre as sequências para o desenho dos *primers* na região 3’ dos genes, que determinam *amplicons* de 150 pb, tamanho que decidimos ser adequado para os dsRNA (Anexos 3 e 10). Verificamos os parâmetros indicadores da qualidade destes *primers* no programa *OligoAnalyzer3.0* (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx/oligocalc.asp>).

Na etapa de produção de dsRNA utilizamos o *kit T7 RiboMAXTM Express Large Scale RNA Production System* (Promega), que necessita da cauda T7 nos fragmentos de DNA para a produção do dsRNA. Dessa forma, adicionamos a sequência T7 TAATACGACTCACTATAGGGCGA na extremidade 5' de todos os *primers*. O mesmo procedimento foi feito com a sequência do plasmídeo pTZ57R/T, sobre a qual desenhamos *primers* em uma região que não apresentou similaridade com nenhuma região de nossos dados de transcriptomas.

6.1.2 – Amplificação dos fragmentos, clonagem e sequenciamento

Prosseguimos com as reações de amplificação com volume total de 20 µl, tampão 10X com KCl comercializado com a *Taq DNA Polymerase* (Thermo Scientific) e os demais reagentes foram utilizados nas seguintes concentrações: MgCl₂ (Thermo Scientific) a 0,25 mM, BSA a 0,05 µg/µl, dNTPs (Thermo Scientific) a 0,2 mM, 0,25u de *Taq DNA Polymerase* (Thermo Scientific) e cDNA de machos ou fêmeas (no caso de *Obp56a*) virgens sexualmente maduros a 0,2 µg/µl. Para a amplificação do controle pTZ57R/T utilizamos o vetor com concentração de 0,5 ng/µl.

Após amplificação, realizamos a purificação dos produtos de PCR utilizando PEG 8000 (Lis & Schleif 1975) como descrito no item 3.3 “Purificação por precipitação com polietilenoglicol”. Porém, utilizamos uma solução de 24% de PEG8000 e NaCl 1,1 M, padronizado para precipitar produtos com mais de 125 pb, uma vez que os fragmentos que originarão o dsRNA possuem entre 150 e 200 pb. O material purificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e quantificamos as amostras através do auxílio de marcador de peso molecular *GeneRulerTM 1kb DNA Ladder* (Thermo Scientific).

Com os produtos purificados e quantificados, utilizamos o kit de clonagem *InsTAclone PCR cloning* (Thermo Scientific) e prosseguimos com reações de ligação no plasmídeo pTZ57R/T

conforme as especificações do fabricante, utilizando-se da proporção 3:1 de massa da amostra em relação à massa do vetor. Fizemos a transformação dos vetores em bactérias *Escherichia coli* da cepa DH5 α quimicamente competentes conforme descrito no item 3.4 “Clonagem”. Amostramos 10 colônias por gene, totalizando em 20 colônias, das quais colocamos uma parte em 20 μ l de água ultrapura e a outra parte em tubos falcon contendo 5,0 ml de meio de cultura LB líquido seletivo (com adição de ampicilina - concentração: 0,1 μ g/ μ l) que utilizamos para a extração alcalina dos plasmídeos descrita no item a seguir. Submetemos as colônias que estavam em água ultrapura por 5 minutos a 90°C para lise das células e liberação dos plasmídeos e, posteriormente, fizemos a PCR direta de colônia com os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse*, para avaliarmos a presença do inserto nas colônias recombinantes (Dallas-Yang *et al.* 1998).

Das 10 colônias para cada gene, após a confirmação da presença do inserto, selecionamos quatro colônias positivas de cada gene e seguimos com a purificação por meio de precipitação diferencial com PEG8000 (24% PEG8000 e 1,1 M NaCl) (Lis & Schleif 1975), como descrito no item 3.3 “Purificação por precipitação com polietilenoglicol” e ressuspendemos em 20 μ l de água ultrapura. Quantificamos em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo utilizando marcador de peso molecular *GeneRulerTM 1kb DNA Ladder* (Thermo Scientific). Selecionamos dos produtos purificados duas colônias de cada gene que apresentaram quantificação igual a 50 ng/ μ l e enviamos para uma empresa especializada (MACROGEN INC., Coréia do Sul) para sequenciamento e assim confirmarmos a sequência do fragmento.

6.1.3 – Extração dos plasmídeos – *miniprep*

Colocamos as colônias amostradas em meio LB líquido descritas no item anterior em agitador automático a 37°C por 16 horas para crescimento das bactérias. Das 20 colônias

amostradas, seguimos com a extração de plasmídeos apenas com as quatro colônias enviadas para sequenciamento, porém, antes disso, com uma alíquota de bactérias, preparamos estas colônias para estocagem em glicerol 80% a -80°C .

Fizemos séries de centrifugações a $9.000 \times g$ por 2 minutos em tubos de 1,5 ml até concentrarmos todas as bactérias presentes nos 5,0 ml de meio. Descartamos todo o sobrenadante e adicionamos 200 μl de solução de ressuspensão celular (Tris-HCl a 50 mM e pH 7,5 e EDTA a 10mM e pH 8,0) e ressuspendemos as células com o auxílio de agitador automático. Depois adicionamos 200 μl de solução de lise celular (SDS 1% e NaOH a 200 mM) e rapidamente homogeneizamos a suspensão por inversão dos tubos (cinco inversões). Deixamos os tubos à temperatura ambiente por cinco minutos, adicionamos 200 μl de solução de neutralização (Acetato de amônio 7,5 M) e homogeneizamos a suspensão por inversão dos tubos (cinco inversões). Deixamos os tubos em gelo por cinco minutos e centrifugamos a $16.000 \times g$ por 10 minutos. Para a purificação dos plasmídeos, adicionamos NaCl a 2,6 M para uma concentração final de 0,2 M e depois 2/3 do volume total de isopropanol 100%. Homogeneizamos os tubos por inversão (50 vezes) e deixamos a temperatura ambiente por dois minutos. Centrifugamos a $16.000 \times g$ por 30 minutos e descartamos o sobrenadante. Adicionamos 500 μl de etanol 70%, homogeneizamos invertendo os tubos (cinco vezes) e centrifugamos a $16.000 \times g$ por 15 minutos. Descartamos o sobrenadante e deixamos o material secar a 37°C . Ressuspendemos o precipitado em 50 μl de *UltraPure™ DEPC-treated water* (Invitrogen™).

6.1.4 – PCR

Como o kit que temos usado para a produção de dsRNA requer grande quantidade de material (1,0 μg de DNA), utilizamos os plasmídeos extraídos e purificados em ampliações por

PCR com um grande volume final de 600 µl que chamamos de “superPCR” totalizando em 15 reações de 40 µl para cada gene. Utilizamos das mesmas condições apresentadas no item 6.1.2 “Amplificação dos fragmentos, clonagem e sequenciamento”.

Agrupamos as reações equivalentes de cada gene, prosseguimos com purificação por meio de precipitação diferencial com PEG8000 (24% PEG8000 e 1,1 M NaCl) (Lis & Schleif 1975), como descrito no item 3.3 “Purificação por precipitação com polietilenoglicol” e ressuspensemos em 50 µl. Quantificamos as amostras em fluorômetro *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen™) com o kit *Qubit® dsDNA HS Assay* (Invitrogen™).

6.1.5 – Produção de dsRNA

Utilizamos o kit *T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System* (Promega) para a produção do RNA dupla-fita. Montamos as reações de 20 µl com 1,0 µg de DNA de cada amostra e demais reagentes conforme as especificações do fabricante. Deixamos as reações a 37°C por três horas e então seguimos com o processo de purificação com fenol/clorofórmio. Adicionamos água *UltraPure™ DEPC-treated water* (Invitrogen™) para um volume final de 100 µl e 300 µl de *TRIzol® Reagent* (Life Technologies™) com 0,7% de β-mercaptoetanol. Homogeneizamos por poucos segundos em agitador automático e incubamos a temperatura ambiente por cinco minutos. Adicionamos 100 µl de clorofórmio com álcool isoamílico na proporção 21:1, homogeneizamos em agitador automático por 15 segundos e incubamos a temperatura ambiente por cinco minutos. Centrifugamos a 4°C e 12.000 x g por 15 minutos e transferimos a fase aquosa para tubos limpos, cuidadosamente, sem encostar-se à fase com fenol. Adicionamos 250 µl de isopropanol 100% e 25 µl de acetato de sódio 3,0 M e pH 5,2 para precipitação do dsRNA e deixamos a temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugamos a 4°C

e 12.000 x g por 10 minutos e descartamos o sobrenadante. Adicionamos 1,0 ml de etanol 75% e agitamos gentilmente para soltar o material precipitado e então centrifugamos a 7.500g por cinco minutos. Descartamos o sobrenadante e secamos o precipitado a temperatura ambiente. Por fim, adicionamos 20 µl de água *UltraPure™ DEPC-treated water* (Invitrogen™) para eluição das amostras.

Depois de pronto, quantificamos o dsRNA em espectrofotômetro *NanoVue™ Plus Spectrophotometer* (GE Helthcare), fizemos alíquotas de 5,0 µl cada e armazenamos a -80°C.

6.2 – Injeção de dsRNA em moscas adultas

Para uma primeira tentativa de silenciamento, escolhemos os genes *AttA* e *Obp99c* por terem demonstrado expressão predominante em machos (Figura 6). Por ser um primeiro experimento de silenciamento com *A. obliqua*, optamos por genes com diferenças de expressões bem contrastantes, a fim de facilitar a visualização de qualquer efeito na expressão mediante qPCR.

Fizemos as injeções de dsRNA em moscas machos adultos virgens e sexualmente maduros com sete dias de idade. Fizemos os aparatos utilizados na injeção manualmente através do aquecimento de pipetas *Pasteur* de vidro, até atingirmos o diâmetro desejado para as agulhas. Em uma primeira tentativa em silenciar o gene *Obp99c*, na extremidade oposta à agulha acoplamos uma mangueira de silicone por onde assoprávamos até a solução contendo dsRNA entrar na mosca. Esse método não permitiu padronizar a pressão e nem o tempo de injeção. Adormecemos as moscas deixando-as cinco minutos no gelo e então imobilizamo-las em placa de isopor com o auxílio de agulhas entomológicas. Com o auxílio de um estereoscópio binocular, fizemos a injeção entre o terceiro e quarto segmento abdominal. A dosagem foi de 0,5 µg de dsRNA contidos em 0,5 µl. Em uma segunda tentativa de silenciamento utilizamos dsRNA do gene *AttA*, na

extremidade oposta à agulha, acoplada à mangueira de silicone, colocamos uma pipeta de 1000 μ l a fim de se homogeneizar mais a pressão de injeção entre os indivíduos tratados. Além disso, fizemos a injeção no tórax, logo abaixo da asa e a dosagem utilizada foi de 1,0 μ g de dsRNA em 0,5 μ l.

Com o objetivo de fazer duas coletas diferentes, uma depois de 24 horas e outras depois de 72 horas da injeção, fizemos dois grupos de moscas o grupo 24h e o grupo 72h tanto para o experimento com dsOvp99c quanto para dsAttA. Cada grupo foi dividido em três subgrupos, o primeiro injetado com dsOvp99c, o segundo foi o subgrupo controle injetado com dspTZ57R/T e o terceiro foi o subgrupo controle sem tratamento. Injetamos oito moscas para o primeiro e segundo subgrupo e separamos sete moscas para o terceiro subgrupo, tanto para o grupo 24h quanto para o grupo 72h. No total, 46 moscas foram utilizadas nesses experimentos. Após a injeção, as moscas foram mantidas em caixas acrílicas com água e alimento nas condições normais de manutenção como descrito no item 1 “criação das moscas”.

6.3 – Avaliação da eficiência do silenciamento

6.3.1 – Extração de RNA e produção de cDNA

Assim que atingido o horário da coleta, adormecemos as moscas em gelo por cinco minutos e as lavamos em água *UltraPure™ DEPC-treated water* (Invitrogen™) e *RNAholder* (BioAgency). Após a lavagem, colocamos as moscas em tubos individualizados e adicionamos 250 μ l de *TRIzol® Reagent* (Life Technologies™) com 0,7% de β -mercaptoetanol, maceramos por 15 segundos, posteriormente adicionamos mais 250 μ l desta solução e maceramos mais 15 segundos, por fim completamos o volume de fenol com β -mercaptoetanol para 1 ml e guardamos as amostras em -80°C . Após a coleta de todas as moscas de cada grupo, prosseguimos com a

extração de RNA total como descrito no item 4.2 “Extração de RNA total” e purificamos e quantificamos as amostras conforme descrito no item 4.3, “Purificação por precipitação com cloreto de lítio”.

De cada amostra de RNA total retiramos 1,0 µg, tratamos com desoxiribonuclease *DNase I Amplification grade* (Invitrogen™) para garantir a não contaminação com DNA o que poderia resultar em falsos valores de expressão, e seguimos com a produção de cDNA por transcriptase reversa utilizando o kit *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad). Diluímos este cDNA a uma concentração final de 5,0 ng/µl para utilização nas amplificações por qPCR.

6.3.2 – qPCR e análise estatística dos dados de expressão

Estando as amostras de cDNA decorrentes dos experimentos de silenciamento prontas, seguimos com as amplificações por qPCR para avaliar o efeito das injeções na expressão dos genes *AttA* e *Obp99c*. Dessa forma, cada grupo, 24 e 72h, com seus três subgrupos, tratados com dsObp99c ou dsAttA, tratados com dspTZ57R/T e sem tratamento, foram amplificados em reações de 10 µl, para o gene a ser analisado, *AttA* ou *Obp99c*, e para dois genes de referência para posterior normalização dos dados, *rpl18* e *ef1a*. As reações foram feitas em triplicata e com NTC em duplicata. Fizemos as amplificações como descrito no item 4.6 “qPCR”.

Visualizamos os resultados de qPCR no programa *Bio-Rad CFX Manager™* (Bio-Rad) e o utilizamos para o cálculo da expressão relativa normalizada de cada gene pelo método do $\Delta\Delta C_q$ ou método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ (Livak & Schmittgen 2001), que calcula a diferença entre os valores de C_q do gene alvo e do gene de referência (ΔC_q) e depois os valores de ΔC_q das amostras são comparados ($\Delta\Delta C_q$).

Para as análises estatísticas utilizamos o programa *StatPlus 2009 Professional 5.8.4* que realizou testes para as três variáveis, subgrupos dspTZ57R/T, dsAttA ou dsObp99c e sem tratamento, para os grupos 24 e 72h. Uma vez rejeitada a normalidade dos dados para todos os subgrupos pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov/Lilliefors Test*, seguimos com o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis ANOVA*, utilizando o nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 – Padronização dos genes de referência para qPCR em *A. obliqua*

A técnica de qPCR tem sido amplamente utilizada para investigar padrões de expressão gênica em diferentes espécies, entretanto requer muito cuidado com as armadilhas intrínsecas da técnica, como a normalização dos dados (Bustin & Nolan 2004) o que pode levar a interpretações erradas dos níveis de expressão. Para minimizar o problema, a expressão relativa de um gene alvo deve ser determinada após a normalização dos dados com os dados de expressão de genes de referência, que devem apresentar expressão estável não influenciada pelo desenho experimental (Radonic *et al.* 2004). Frequentemente, a escolha de genes de referência é baseada em estudos anteriores, porém os níveis de expressão de diferentes genes podem variar entre diferentes condições experimentais e espécies, sendo que não há um melhor grupo de genes de referência que seja universal entre diferentes organismos e desenhos experimentais. Sendo assim, qualquer estudo que utilize qPCR com o objetivo de investigar padrões de expressão deve começar pela identificação e validação de genes de referência adequados para as condições experimentais. Com o objetivo de se identificar o melhor gene de referência ou conjunto de genes para estudos de expressão por qPCR em fases de vida de *A. obliqua*, escolhemos e analisamos a expressão de oito genes candidatos, dos quais a maioria já havia sido investigada como gene de referência em outros insetos.

De todos os pares de *primers* testados para os oito genes candidatos a gene de referência, todos apresentaram bons coeficientes de correlação, entre 0,936 e 0,999 (Tabela 1; Anexo 1), na análise de eficiência de reação por curva padrão. Seis genes, *btub*, *ef1a*, *gapdh*, *rpl18*, *rps17* e *act* conduziram a reações com eficiência aceitável, entre 95% e 105% (Bustin *et al.* 2009), enquanto que os *primers* para *Syx* e *TpnC* mostraram eficiência fora desse limites (Tabela 1; Anexo 1). Todas

as reações conduziram a ampliações específicas, como demonstrado pelas análises de curva de desnaturação (*melting*) (Anexo 1).

Tabela 1. Eficiência de reação dos oito genes candidatos a gene de referência para estudos de expressão por qPCR em *A. obliqua* ao longo das fases do desenvolvimento, por análise de curva padrão.

Símbolo	Nome	Número de acesso do <i>GenBank</i> *	Função	T _h (°C)	Eficiência PCR (%)	Coefficiente de correlação	Primer forward	Primer reverse
Act	Actin	L12254.1	Constituinte estrutural do citoesqueleto	59	95,3	0,994	TGACGATGAGGTTGCTGCTT	TTGTCCCATACCGACCATCA
<i>Btub</i>	<i>β-Tubulin</i>	EU980443.1	Constituinte estrutural do citoesqueleto	59	101,3	0,995	CCCTCACCCAAAGTATCAGAC	TGGTCAATTCAGAGTGCGG
<i>Ef1a</i>	<i>Elongation factor 1α</i>	GU339154.1	Fator de alongação na translação	59	100,0	0,999	TTGCCTTCGTACCAATCTCTG	AACCTCCATCCCTGAACC
<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase</i>	GU269901.1	Atividade de fosforilação (NAD ⁺)	58	98,7	0,995	AAACTGTGGCGTGATGGAC	GACTGAGACATTGGGTGTGG
<i>RpL18</i>	<i>Ribosomal protein L18</i>	NM_139834.2	Constituinte estrutural do ribossomo	58	99,0	0,997	GTGCCTAAGATGACCATTGTC	GACCTCCAGCCTTAATGATACG
<i>RpS17</i>	<i>Ribosomal protein S17</i>	NM_079278.2	Constituinte estrutural do ribossomo	58	103,4	0,993	GCCGCAAAGGTCATAATTGAG	GCTACTTCTTCACAAATACGCT
<i>Syx</i>	<i>Syntaxin</i>	NM_168905	Receptor SNAP	58	107,2	0,936	GAAATCTACAAGAAACTCGGTGC	CACACTTGTTGCTCCACAG
<i>TpnC</i>	<i>Troponin C</i>	EZ423429.1	Proteína de ligação ao cálcio	58	109,1	0,988	TCCTGAAAGAGTTAGACGAT	CTCTCTGTCATCATTTCCAT

T_h corresponde a temperatura de hibridação do *primers*.

* O número de acesso do *GenBank* é referente ao número de acesso das sequências de espécies filogeneticamente próximas utilizadas nos alinhamentos. A escolha da espécie foi definida pela disponibilidade de dados no *GenBank*.

As reações foram realizadas com os *primers* em uma concentração final de 0,2 mM.

Os valores de C_q gerados pelas reações de amplificação dos genes candidatos a gene de referência foram utilizados nas análises de estabilidade gênica. Os valores médios de C_q para cada fase de vida variaram diferentemente entre os genes candidatos (Figura 2; Anexo 2), sendo que os valores de desvio padrão (σ) entre essas médias para cada gene variou de 0,76 a 2,91, sendo o menor valor apresentado pelo gene *rpl18* e o maior valor pela *act*.

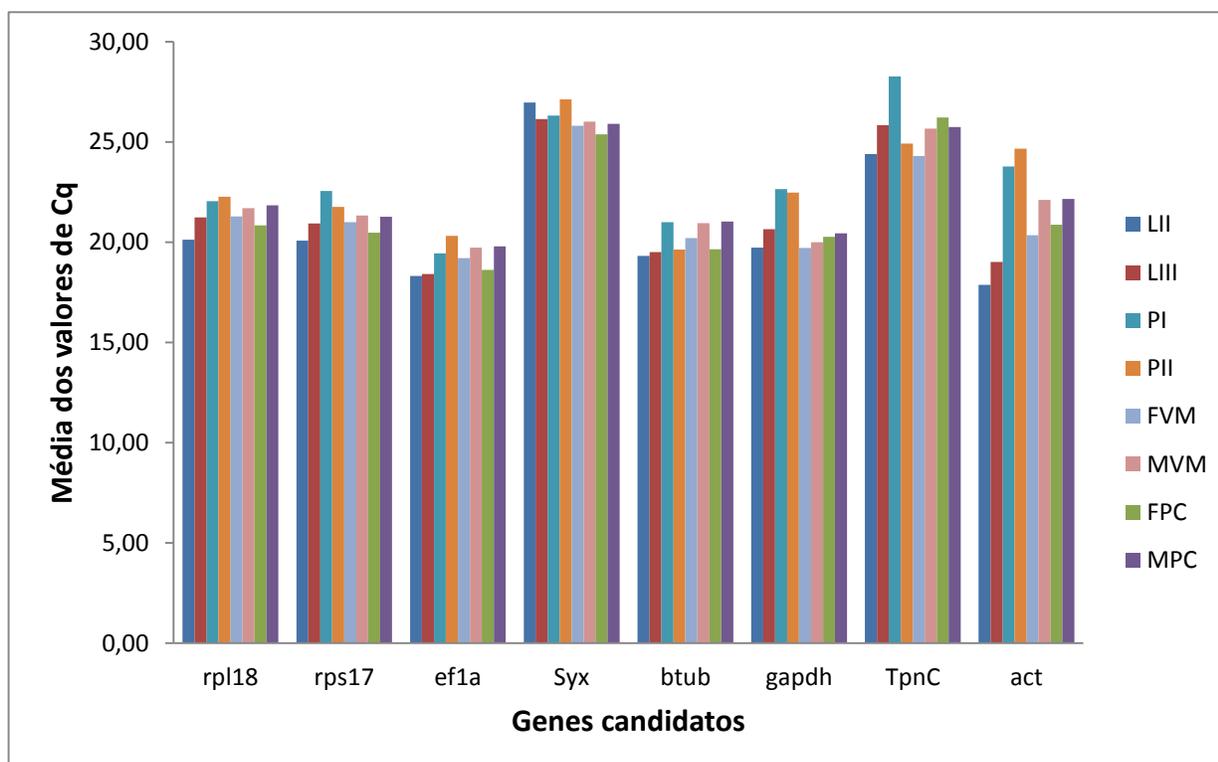


Figura 2. Expressão gênica dos oito genes candidatos a gene de referência para estudos de expressão por qPCR em *A. obliqua* ao longo das fases de vida. As barras mostram as médias dos valores de Cq de três réplicas biológicas para cada fase de vida em triplicata. *rpl18* (*ribosomal protein L18*), *btub* (β -*Tubulin*), *ef1a* (*elongation factor 1 α*), *rps17* (*ribosomal protein S17*), *gapdh* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *Syx* (*syntaxin*), *TpnC* (*troponin C*) e *act* (*actin*). LII – larvas de segundo instar; LIII – larvas de terceiro instar; PI – pupas de primeiro estágio; PII – pupas de segundo estágio; FVM – fêmeas virgens sexualmente maduras; MVM – machos virgens sexualmente maduros; FPC – fêmeas 24 horas pós-cópula; MPC – machos 24 horas pós-cópula.

A fim de se analisar a variação entre as fases de vida dentro dos diferentes genes candidatos, fizemos um diagrama de caixa (*Box plot*) com os valores de Cq (Figura 3) que revelou dois grupos com diferentes padrões de expressão. Um grupo apresenta dois genes com níveis de expressão muito baixos: *Syx* e *TpnC*. O outro grupo consiste de genes que apresentaram níveis de expressão maiores: *rpl18*, *rps17*, *ef1a*, *btub*, *gapdh*, e *act*. Embora *act* apresente uma média de expressão compatível com este último grupo, a ampla dispersão dos dados que ela apresenta a distingue dos demais ($\sigma = 2,91$). Além disso, o diagrama mostra que *rpl18*, *btub*, *ef1a* e *Syx* apresentaram as mais baixas variações de expressão dentre as fases de vida entre os genes investigados, o que é refletido pelos seus valores de desvio padrão: 0,76, 1,23, 0,85 e 1,14 respectivamente. Assim como

act, *TpnC* também mostrou ampla dispersão dos dados ($\sigma = 2,02$), tornando-o inadequado como gene de referência.

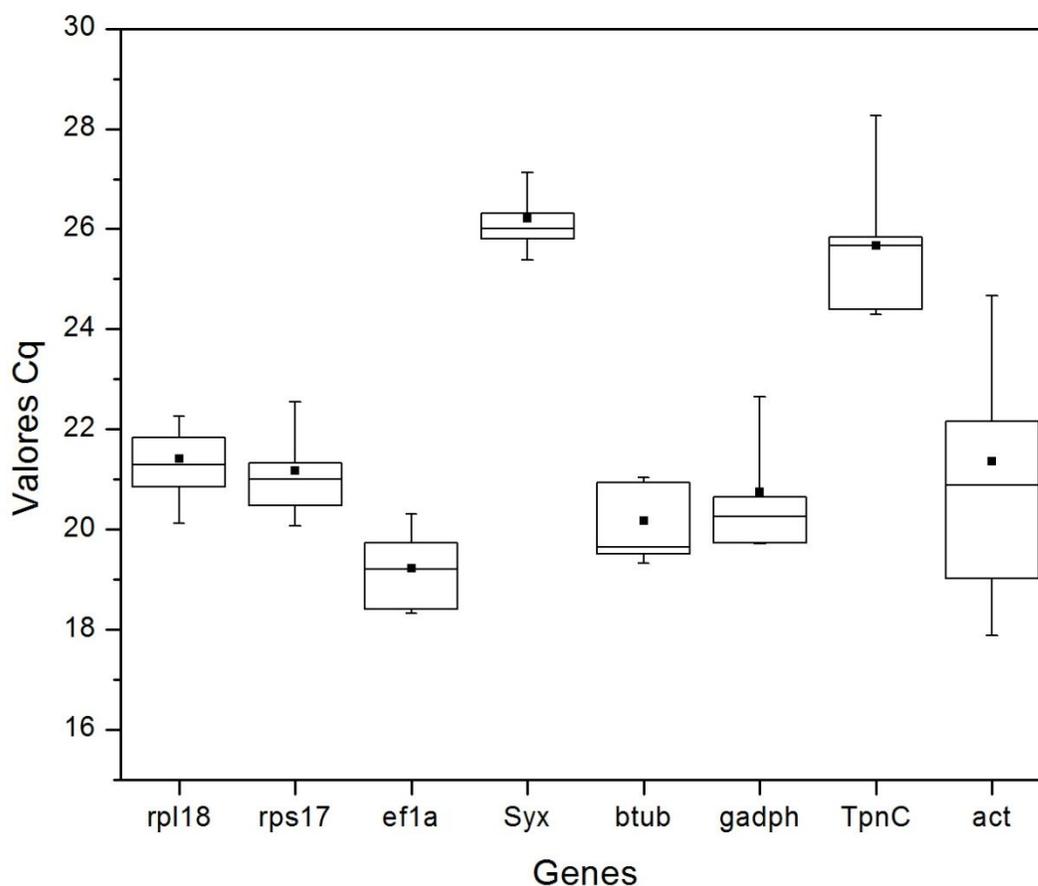


Figura 3. Variação dos níveis de expressão dos candidatos a gene de referência para estudos de expressão por qPCR em *A. obliqua* ao longo das fases de vida. Box-plots mostram medianas (linhas), médias (pontos), Percentil de 95% (caixas) e variação (hastes); ($n = 24$). A variação no nível de expressão de cada gene candidato foi estimado em oito estágios de vida diferentes de *Anastrepha*, cada estágio com três réplicas técnicas. *rpl18* (ribosomal protein L18), *btub* (β -Tubulin), *ef1a* (elongation factor 1 α), *rps17* (ribosomal protein S17), *gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *Syx* (syntaxin), *TpnC* (troponin C) e *act* (actin).

Conduzimos as análises de estabilidade da expressão gênica no programa *RefFinder* que fez um ranqueamento dos oito candidatos a gene de referência, do mais estável ao menos estável baseando-se em quatro dos algoritmos mais utilizados, *geNorm* (Vandesompele et al. 2002), *Normfinder* (Andersen et al. 2004), *BestKeeper* (Pfaffl et al. 2004) e o método comparativo ΔC_t (Silver et al. 2006). O *geNorm*, além de analisar a estabilidade de expressão de cada gene, descreve a variação de um candidato em relação aos outros, determinando, dessa forma, um número ótimo

de genes de referência para dado desenho experimental. Para nosso conjunto de dados, *geNorm* indicou que a dupla de genes *rpl18* e *rps17* apresenta a melhor relação de estabilidade (Figura 4A), resultado que foi complementado pelo *NormFinder* que, apesar de não indicar um número ótimo de genes de referência, apontou o *rpl18* como sendo o mais estável, seguido do *rps17* (Figura 4B). Esta relação se inverte ao utilizarmos o método comparativo ΔC_t que indicou o *rps17* como o mais estável seguido de *rpl18* (Figura 4D). Já o *BestKeeper*, indicou o gene *Syx* como sendo o mais estável seguido de *rpl18* (Figura 4C).

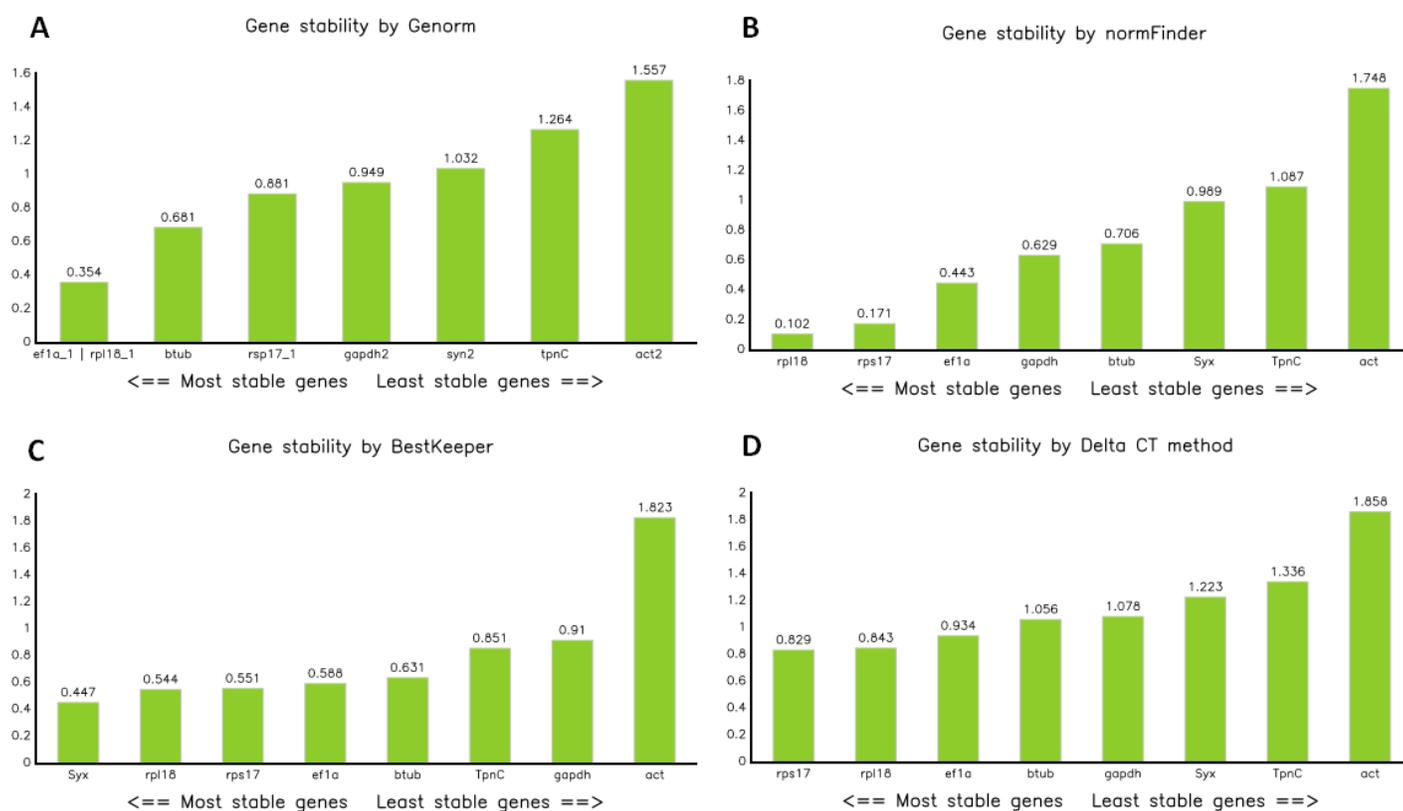


Figura 4. Análise de estabilidade da expressão gênica ao longo das fases de vida de *A. obliqua* de oito genes candidatos a gene de referência de acordo com quatro algoritmos. A – Estabilidade da expressão gênica de acordo com *geNorm*. B – Estabilidade da expressão gênica de acordo com *Normfinder*. C – Estabilidade da expressão gênica de acordo com *BestKeeper*. D – Estabilidade da expressão gênica de acordo com o método comparativo ΔC_t . Genes com maior estabilidade são classificados da esquerda para a direita. *rpl18* (*ribosomal protein L18*), *btub* (β -*Tubulin*), *ef1a* (*elongation factor 1 α*), *rps17* (*ribosomal protein S17*), *gapdh* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *Syx* (*syntaxin*), *TprC* (*troponin C*) e *act* (*actin*).

O *RefFinder* levou em consideração todas as estimativas de estabilidade apresentadas por esses quatro algoritmos e fez um ranque dos oito candidatos a gene de referência para *A. obliqua* (Figura 5) sendo *rpl18*, *rps17* e *ef1a* os genes que apresentam maior estabilidade de expressão para o desenho experimental aqui proposto. Dessa forma, ao considerarmos a eficiência de reação ao longo de uma diluição seriada e a estabilidade apresentada por esses programas de todos os genes candidatos à referência temos que *rpl18*, *rps17* e *ef1a* são os genes mais estáveis, o que os validam como bons genes de referência para estudos de expressão ao longo das fases de vida de *A. obliqua*.

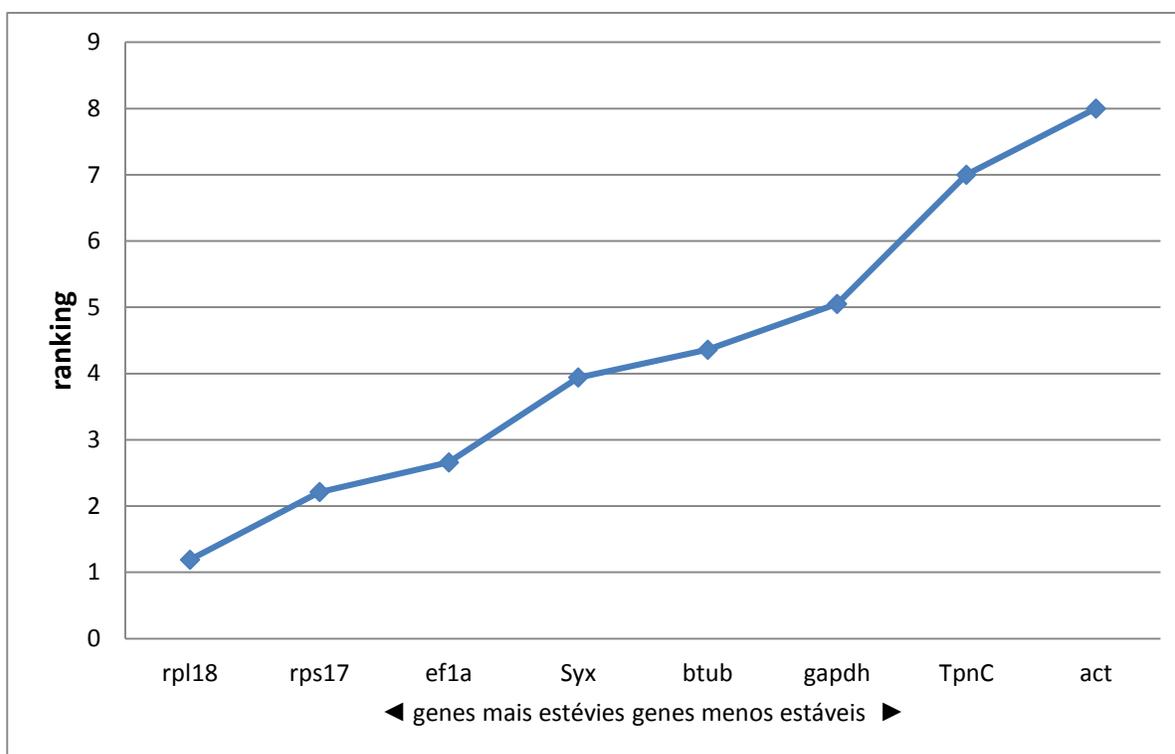


Figura 5. Ranque dos genes candidatos a gene de referência de acordo com a estabilidade da expressão gênica baseado no programa *RefFinder*. *RefFinder* calcula a média geométrica de acordo com a estabilidade da expressão gênica com base em diferentes algoritmos (geNorm, NormFinder, BestKeeper e método ΔC_q). Genes com maior estabilidade são classificados da esquerda para a direita. *rpl18* (*ribosomal protein L18*), *btub* (β -*Tubulin*), *ef1a* (*elongation factor 1 α*), *rps17* (*ribosomal protein S17*), *gapdh* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *Syx* (*syntaxin*), *TpnC* (*troponin C*) e *act* (*actin*).

Em estudos anteriores, *rpl18* foi investigado como gene de referência para estudos de expressão por qPCR em *Cimex lectularius* e *Leptinotarsa decemlineata* (Mamidala *et al.*, 2011;

Shi *et al.*, 2013), apresentando-se como gene mais estável para essas espécies. *rps17* teve sua estabilidade analisada em três moscas da família Calliphoridae (Diptera) (Cardoso *et al.* 2014), mas não se apresentou como apropriado gene de referência para qPCR nestas espécies; mas em teste para *Aedes aegypti* com diferentes idades (Cook *et al.* 2006), se mostrou o mais apropriado sendo amplamente usado nesta espécie para normalização dos dados de expressão em diversas condições experimentais (Hugo *et al.* 2010; Shin *et al.* 2011; Coggins *et al.* 2012). *ef1a* foi investigado para *Bombus terrestris*, *Bombus lucorum*, *Bactrocera dorsalis*, *Cimex lectularius* and *Leptinotarsa decemlineata* (Hornáková *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010; Mamidala *et al.*, 2011; Ling & Salvaterra, 2011; Shi *et al.*, 2013), mostrando resultados confiáveis apenas para *B. lucorum*. Esta grande variedade de resultados para os mesmos genes em diferentes estudos e diferentes desenhos experimentais reforça a importância da busca e padronização de genes de referência adequados para qPCR. Outro fato interessante é que apesar de *B. terrestris* e *B. lucorum* pertencerem ao mesmo gênero, necessitam de diferentes genes de referência, enfatizando a necessidade de padronização até para espécies próximas (Hornáková *et al.*, 2010).

Outro fato que ressalta a importância da padronização em estudos específicos para cada espécie para qPCR é a ampla variação de expressão apresentado pelo gene *act* mostrado pelos nossos resultados, o que revela que *act* é o gene menos indicado como gene de referência para *A. obliqua*, nos contrastes por nós feitos. Este gene codifica a proteína actina, um constituinte estrutural do citoesqueleto, que tem participação na mobilidade das células e na manutenção do citoesqueleto (Goldstein & Gunawardena, 2000). Além disso, em *Drosophila*, actina opera importantes e conservadas funções como a citocinese durante a mitose celular (Echard *et al.*, 2004; Eggert *et al.*, 2004; Dean *et al.*, 2005), a organização do centrossoma (Muller *et al.*, 2010), e a fagocitose (Stroschein-Stevenson *et al.*, 2006). Portanto, este é um gene amplamente utilizado como gene de referência em estudos de expressão por qPCR em uma grande gama de organismos.

Por exemplo, este gene se mostrou entre os mais estáveis em moscas da ordem Diptera como *B. dorsalis*, um tefritídeo (Shen *et al.*, 2010), e *D. melanogaster* (Ponton *et al.*, 2011). Entretanto, nossos dados mostraram que *act* teve a maior dispersão dos valores de expressão entre as fases do desenvolvimento de *A. obliqua*, sendo assim inapropriado como gene de referência em estudos de expressão por qPCR nesta espécie.

Este foi o primeiro estudo a buscar por genes de referência confiáveis para estudos de expressão gênica por qPCR em espécies do gênero *Anastrepha* ao longo de fases do desenvolvimento. Oito candidatos a gene de referência foram analisados e ranqueados de acordo com a eficiência da reação e a estabilidade de expressão. Apesar do gene *act* ser citado na literatura como bom gene de referência e ser amplamente utilizado em estudos com qPCR em diversos organismos, ele mostrou os piores valores de estabilidade para *A. obliqua* nas condições experimentais testadas. No entanto, *rpl18*, *rps17* e *ef1a* apresentaram maior estabilidade, mostrando eficiência apropriada e as menores variações nos níveis de expressão entre os diferentes contrastes que comparamos. Dessa forma, consideramos *rpl18*, *rps17* e *ef1a* apropriados genes de referência para estudos de expressão por qPCR em *A. obliqua* ao longo das fases de desenvolvimento. Qualquer outra condição diferente dessas testadas irá requerer novos estudos de validação de genes de referência.

2 – Escolha dos genes candidatos

A partir dos transcriptomas de cabeça e tecido reprodutivo de *A. fraterculus* (Rezende, V.B.; Congrains, C.C.; Lima, A.L.A.; Campanini, E.B.; Nakamura, A.M.; Oliveira, J.L.; Chahad-Ehlers, S.; Sobrinho Jr, I.; de Brito, R.A.; dados não publicados), escolhemos 14 genes (Tabela 2), utilizando como critério os resultados gerados das análises de expressão diferencial feitas entre os transcriptomas de machos virgens e machos pós-cópula de *A. fraterculus*, acreditando no potencial

dos genes indicados como diferencialmente expressos entre estes perfis estarem diretamente envolvidos na reprodução. O que também nos guiou nesta escolha foi procurar por genes pertencentes a famílias gênicas já associadas ao processo reprodutivo como proteases (Hittinger & Carroll 2007; Kelleher *et al.* 2007; Lawniczak & Begun 2007; Kelleher & Pennington 2009), proteínas do sistema imune (Lawniczak *et al.* 2006) e proteínas ligantes de odores (Matsuo *et al.* 2007; Li *et al.* 2008). Para estes genes, desenhamos *primers* com o objetivo de obtermos a sequência dos fragmentos mediante amplificação, clonagem e sequenciamento.

Obtivemos o sequenciamento de oito dos 14 genes selecionados, sendo eles: *DptB*, *CG9134*, *CG14645*, *CG5379*, *Jon65Aiv*, *Obp19d*, *Obp56a* e *Obp99c*, permitindo a conferência das sequências e a identificação das regiões mais confiáveis e apropriadas para o desenho dos *primers* para qPCR. Não sequenciamos os seis genes restantes, entre eles *AttA*, *Acp65Aa*, *CG11912*, *CG30025*, *Peritrophin-15b*, e *θTry* devido a problemas com a otimização das reações de amplificação e com a eficiência da clonagem.

Tabela 2. Genes escolhidos para estudo por apresentarem diferença de expressão significativa entre machos virgens e machos pós-cópula segundo os dados dos transcriptomas de *A. fraterculus*.

	Gene	Símbolo	envolvido em	logFC	logCPM	mais expresso em
	<i>Adult cuticle protein 65Aa</i>	<i>Acp65Aa</i>	constituente estrutural da quitina	4.500072	4.280704	virgem
	-	<i>CG9134</i>	ligação à carboidrato	-11.8014	6.821547	pós-cópula
	-	<i>CG14645</i>	metabolismo da quitina	-4.24944	5.204345	pós-cópula
Tecidos de Cabeça	<i>Diptericin B</i>	<i>DptB</i>	resposta imune	5.31748	5.384552	virgem
	<i>Odorant-binding protein 99c</i>	<i>Obp99c</i>	ligação à odores, percepção de estímulos químicos	-4.62665	11.25094	pós-cópula
	<i>Peritrophin-15b</i>	<i>Peritrophin-15b</i>	ligação à quitina	-11.6336	6.655175	pós-cópula
	<i>ϑTrypsin</i>	<i>ϑTry</i>	proteólise	-7.71937	7.036613	pós-cópula
	<i>Adult cuticle protein 65Aa</i>	<i>Acp65Aa</i>	constituente estrutural da quitina	2.700808	1.801131	virgem
	<i>Attacin-A</i>	<i>AttA</i>	resposta imune	3.884171	8.912351	virgem
	-	<i>CG5379</i>	atividade carbonato desidratase	-6.52128	6.954454	pós-cópula
Tecido reprodutivo	-	<i>CG11912</i>	proteólise	-6.45478	6.605921	virgem
	-	<i>CG30025</i>	proteólise	-11.0091	5.622516	pós-cópula
	<i>Jonah 65Aiv</i>	<i>Jon65Aiv</i>	proteólise	-7.91297	7.228896	pós-cópula
	<i>Odorant-binding protein 19d</i>	<i>Obp19d</i>	ligação à odores, percepção de estímulos químicos	-3.47735	6.501031	pós-cópula
	<i>Odorant-binding protein 56a</i>	<i>Obp56a</i>	ligação à odores, percepção de estímulos químicos	4.199486	8.609884	virgem

LogCF corresponde a diferença de expressão comparando os contrastes. LogCPM corresponde ao log da quantidade de contagens por milhão.

Dos genes inicialmente selecionados, prosseguimos as análises com os genes *CG14645*, *Jon65Aiv*, *Obp19d*, *Obp56a* e *Obp99c*, e mesmo com os genes *AttA*, *CG11912*, *CG30025* e *θTry*, embora não tenhamos sido bem sucedidos em seu sequenciamento, devido aos processos biológicos dos quais participam e que julgamos interessante para este trabalho. *CG11912*, *CG30025*, *Jon65Aiv* e *θTry* são peptidases *trypsin-like* que possuem atividade serina peptidase e participam de processos de proteólise, fazendo parte da família S1 de quimotripsinas em *D. melanogaster* (Ross et al. 2003). O gene *AttA* está envolvido em processos de resposta imune humoral, ou seja, proteínas que atuam na defesa imunológica do meio extracelular, fazendo parte do grupo dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) em *D. melanogaster* (Verleyen et al. 2006), participando também, nestes organismos, da resposta a bactérias gram-positivas (Gordon et al. 2008). *Obp19d*, *Obp56a* e *Obp99c* são proteínas ligantes a odores (*odorant binding proteins*) que participam de processos de percepção sensorial de estímulos químicos em *D. melanogaster* (Hekmat-Safe et al. 2002; Vieira & Rozas 2011). Já o gene *CG14645*, que tem um domínio de ligação à quitina, apresentou expressão diferencial em fêmeas de *D. melanogaster* submetidas a sons de corte de machos da mesma espécie e machos de *D. simulans*, indicando seu potencial papel na corte de *Drosophila* (Immonen & Ritchie 2012).

Escolhemos os genes com base nos transcriptomas de *A. fraterculus* por esses serem os primeiros e únicos dados de sequenciamento de próxima geração disponíveis no momento em que estávamos escolhendo os genes para este projeto. Transcriptomas de *A. obliqua* para os mesmos contrastes feitos em *A. fraterculus* foram gerados posteriormente ao início deste trabalho. No entanto, não acreditamos ser este um problema devido à grande proximidade evolutiva entre as espécies *A. fraterculus* e *A. obliqua*, consideradas espécies irmãs, o que torna provável não apenas que os padrões de expressão (e genes diferencialmente expressos) não sejam muito distintos além

das regiões utilizadas para o desenho dos diferentes *primers* utilizados neste trabalho se manterem conservadas, sempre que possível (Anexos 3 – 11).

3 – Padrão de expressão dos genes candidatos em *A. obliqua*

Antes dos estudos de expressão, conferimos a eficiência dos *primers* por meio da curva padrão. Todos os pares de *primers* conduziram a reações com eficiência dentro do aceitável, entre 95% e 105% (Bustin *et al.* 2009) (Tabela 3; Anexo 12). Os dados apresentaram bons coeficientes de correlação entre 0,989 e 0,999 (Tabela 3; Anexo 12), indicando um relacionamento linear entre os valores de Cq e a quantidade inicial de material de cada amostra da diluição seriada. Todas as reações conduziram a amplificações específicas, como demonstrado pelas análises de curva de desnaturação (*melting*) (anexo 12).

Tabela 3. Eficiência de reação dos nove genes escolhidos para estudos de expressão por qPCR em *A. obliqua* ao longo de fases do desenvolvimento, por análise de curva padrão.

Gene (Símbolo)	Número de acesso do GenBank*	T _m (°C)	Eficiência PCR (%)	Coefficiente de correlação	Primer forward	Primer reverse
<i>Atta</i>	XM_004520251.1 Cc	60	102,1	0,993	GTTGCTACGAACCCTAATGG	AAGTCCCTTGACATTGGC
<i>CG11912</i>	XM_004536191.1 Cc	60	101,3	0,999	TGCTTGCCCAATGTGCTC	GCCATCGGTGCTACCAGC
<i>CG14645</i>	XM_004534205.1 Cc	60	99,6	0,989	TTGGTAGTTTTGTTGGTGGC	TTTGCTCTGGACATCTCTCG
<i>CG30025</i>	NM_165825.2 Dm	60	97	0,997	GGCGGTGTATTGATACAGG	GATTGCTTTGATGGATGAACCTG
<i>Jon65Aiv</i>	XM_004524398.1 Cc	60	98,5	0,998	TGCGGTGGTCTTTGATTGG	ACCCAAGTAGACGGTGACAG
<i>Obp19d</i>	XM_004524978.1 Cc	60	100,5	0,999	CAAATGACAAAGCTAAGTGCCTG	CATCACCATCAGCAACTGC
<i>Obp56a</i>	XM_004517843 Cc	60	100,1	0,994	TGGCGACAGTTCTACTCTG	GACGATAGGCAATCCAAGC
<i>Obp99c</i>	XM_004521129.1 Cc	60	100	0,994	CGGATGTACCAGAGGTAACCTC	ATCTTCAGCATTATTTGGGTCC
<i>θTry</i>	XM_004517710.1 Cc	60	104,6	0,999	TTGTCTTCCAGTGGCAG	AGCATTTAGTACCCCAACCG

T_m corresponde a temperatura de hibridação dos *primers*.

Atta – Attacin-A, *CG11912*, *CG14645*, *CG30025*, *Obp19d* – Odorant-binding protein 19d, *Obp56a* – Odorant-binding protein 56a, *Obp99c* – Odorant-binding protein 99c, *θTry* – *θTrypsin*.

* As siglas em frente ao número de acesso do GenBank são referentes à *C. capitata* (Cc) e *D. melanogaster* (Dm). As reações foram realizadas com os *primers* em uma concentração final de 0,3 mM.

A Figura 6 mostra a expressão relativa normalizada de cada fase do desenvolvimento de *A. obliqua* dos nove genes candidatos. Os valores de expressão normalizados de todos os perfis dos nove genes estão dispostos no Anexo 13. Fizemos a normalização dos dados com o uso dos genes de referência *rlp18*, *rps17* e *ef1a* (Anexo 1). Os genes *CG11912*, *CG14645*, *Obp19d*, *Obp56a* e *Obp99c* apresentaram expressão quase que exclusiva para as diferentes fases fisiológicas de adultos, virgens e pós-cópula. Já os genes *Atta*, *CG30025*, *Jon45Aiv* e *θTry*, além de mostrarem expressão nas fases adultas, também mostram expressão em fases de larva ou pupa, mas nenhum gene apresentou expressão exclusiva nestas fases (larvas de instar II e III e pupas de estágio I e II). *Atta* foi o único gene que apresentou expressão na fase de pupa. Das quatro peptidases estudadas, *CG30025*, *Jon45Aiv* e *θTry* apresentaram expressão em ambas as fases larvais (segundo e terceiro instar).

Apesar de termos escolhido estes genes candidatos a partir de dados de expressão de transcriptomas de machos, podemos observar na Figura 6 que os genes *CG11912*, *CG14645*, *CG30025*, *Jon65Aiv*, *Obp19d* e *θTry* apresentaram níveis de expressão comparáveis em ambos os sexos. Apenas *Atta* e *Obp99c* mostraram-se com expressão quase exclusiva para machos e bem baixa em fêmeas. Além disso, o gene *Obp56a* mostrou alta expressão apenas em fêmeas virgens. Sendo assim, as fases relativas às fêmeas não podem ser ignoradas, expandindo nossa atenção e foco de discussão também para este perfil.

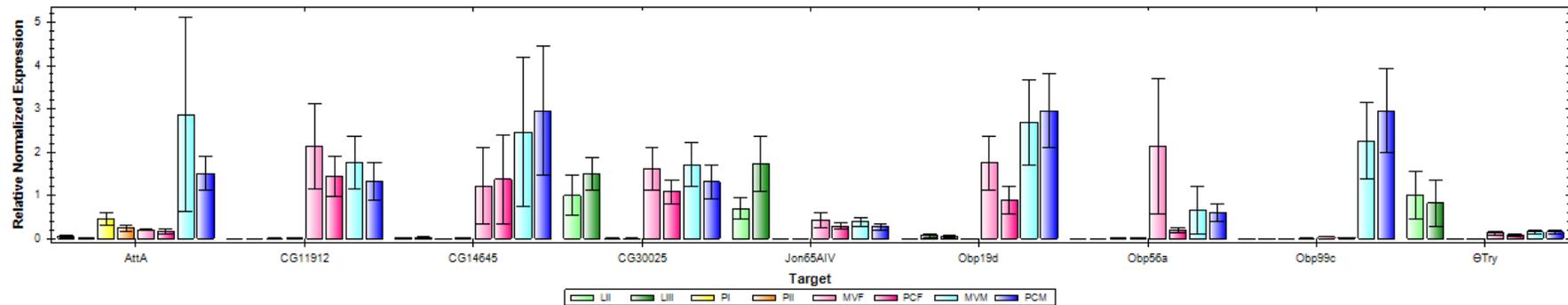


Figura 6. Expressão normalizada de nove genes candidatos potencialmente associados ao processo reprodutivo em *A. obliqua*. Cada barra representa a expressão normalizada com os genes de referência *rlp18*, *btub* e *ef1a*. LII – larvas de segundo instar; LIII – larvas de terceiro instar; PI – pupas de primeiro estágio; PII – pupas de segundo estágio; MVF – fêmeas virgens sexualmente maduras; MVM – machos virgens sexualmente maduros; PMF – fêmeas 24 horas pós-cópula; PMM – machos 24 horas pós-cópula. *AttA* – *Attacin-A*, *CG11912*, *CG14645*, *CG30025*, *Obp19d* – *Odorant-binding protein 19d*, *Obp56a* – *Odorant-binding protein 56a*, *Obp99c* – *Odorant-binding protein 99c*, *thetaTry* – *thetaTrypsin*.

Ao escolhermos esses genes candidatos, utilizamos como critério de seleção a diferença de expressão entre os perfis virgens e pós-cópulas de machos apresentada pelas análises de expressão diferencial feitas com nossos dados de transcriptomas. Porém, quase todos os genes apresentaram níveis semelhantes de expressão relativa normalizada entre esses perfis (Anexo 13), inclusive as proteases *CG11912*, *CG30025*, *Jon65Aiv* e *θTry*.

Escolhemos quatro proteínas com atividade na proteólise devido ao fato de muitas proteases estarem relacionadas com o processo reprodutivo, sendo que diversas são até reguladas pela cópula (McGraw *et al.* 2004; Mack *et al.* 2006; Lawniczak & Begun 2007; Pilpel *et al.* 2008; Kelleher & Pennington 2009). Proteínas secretadas podem ter um amplo papel na reprodução, promovendo a proteólise de peptídeos e enzimas ativas no trato reprodutivo das fêmeas acarretando em respostas após a cópula. Muitas dessas proteínas provêm de glândulas acessórias dos machos (*accessory gland proteins* – Acps) e são transferidas às fêmeas através do fluido seminal durante a cópula, acarretando em diversas respostas fisiológicas nas fêmeas (Wolfner 1997; Swanson & Vacquier 2002; Gillott 2003), entre elas o aumento da oviposição por indução da oogênese (Soller *et al.* 1999; Heifetz *et al.* 2001) e ovulação (Heifetz *et al.* 2000); a diminuição da eclosão dos ovos de fêmeas após a cópula (Prout & Clark 2000); a diminuição da receptividade da fêmea para novas cópulas (Chen *et al.* 1988; Miyatake *et al.* 1999); e a influência no armazenamento de esperma (Neubaum & Wolfner 1999; Tram & Wolfner 1999).

Além disso, em *D. melanogaster*, proteases de serina foram encontradas no trato reprodutivo de fêmeas (Kelleher *et al.* 2007; Kelleher & Pennington 2009) e são reguladas pela cópula (McGraw *et al.* 2004; Mack *et al.* 2006; Lawniczak & Begun 2007; Pilpel *et al.* 2008; Kelleher & Pennington 2009). McGraw e colaboradores (2004) avaliaram o efeito do esperma, Acps e outros fatores relacionados à cópula na regulação de alguns grupos protéicos. Entre as

proteases de serina que tiveram a expressão diminuída em fêmeas devido à cópula, estão os genes *CG11912*, *Jon65Aiv* e *θTry*. Porém, nossos dados não revelaram nenhuma diferença nos níveis de expressão das quatro proteases de serina (*CG11912*, *CG30025*, *Jon65Aiv* e *θTry*) em *Anastrepha*, tanto em fêmeas quanto em machos, que sugerisse tal regulação por fatores relacionados à cópula como descrito na literatura para *Drosophila*.

O único gene que apresentou alta diferença de expressão em virgem em relação à pós-cópula foi *Obp56a*, que apresentou a expressão em fêmeas virgens 11 vezes maior em relação à fêmeas pós-cópula. Porém, outro fator interessante é a alta expressão em machos apresentado pelos genes *AttA* e *Obp99c* (Figura 6). Em *AttA*, machos virgens tem a expressão seis vezes maior, e machos pós-cópula três vezes maior, quando comparados ao terceiro perfil com maior expressão, pupa de primeiro estágio. Já em *Obp99c* essas diferenças são mais discrepantes, sendo a expressão em macho virgem 52 maior e em macho pós-cópula 69 vezes maior quando comparado ao terceiro perfil de maior expressão, fêmeas virgens.

3.1 – Proteínas ligantes a odores

Uma das características dos insetos que faz com que sejam um grupo de grande sucesso é seu sofisticado sistema olfatório fundamental para sua sobrevivência e reprodução. Desde o estímulo químico até a resposta comportamental, o processo olfatório envolve a captação, ligação, transporte e inativação de odores; a ativação de receptores e transdução de sinais; e a percepção do odor mediante processamento dos sinais em vários níveis do sistema nervoso central (Benton 2006; Leal 2013). Neste processo, as OBPs, proteínas ligantes a odores descobertas em insetos no começo dos anos 80 (Vogt & Riddiford 1981), fazem a ligação entre o meio externo e os receptores de odor (ORs), descobertos em *Drosophila* quase duas décadas depois (Clyne *et al.* 1999; Vosshall *et al.* 1999).

Por ser uma via de interação do ambiente com o inseto, acarretando em respostas comportamentais, as proteínas envolvidas no sistema olfatório têm sido alvo de estudos para futuro desenvolvimento de estratégias para controle de insetos praga (Zheng *et al.* 2013; Ohta *et al.* 2014; Yi *et al.* 2014b) bem como de insetos vetores de doenças (Bohbot & Vogt 2005; Leal *et al.* 2008; Lagarde *et al.* 2011; Tsitsanou *et al.* 2012). Essas proteínas estão intimamente envolvidas com o processo reprodutivo, uma vez que participam ativamente de funções como a escolha de parceiros para o acasalamento tanto em machos como em fêmeas e a busca pelas fêmeas por sítios de oviposição (Benton 2006; Matsuo *et al.* 2007; Pelletier *et al.* 2010; Leal 2013; Yi *et al.* 2014b). Sendo assim, o grupo das OBPs pode revelar bons candidatos para estudos evolutivos e de diferenciação de espécies, uma vez que estes genes são substrato para seleção sexual, e candidatos para desenvolvimento de estratégias de controle de populações.

Em um estudo com *D. melanogaster* de McGraw e colaboradores (2004), citado anteriormente, que avaliou a alteração da expressão de diversos grupos protéicos em fêmeas por fatores como esperma, Acps e outros fatores relacionados à cópula, algumas OBPs também mostraram ter sua expressão regulada pelo acasalamento. Entre elas, *Obp56a* e *Pbprp3* (*Obp83a*) se mostraram reguladas pelo esperma e *Obp50e*, *Obp56g*, *Obp59c*, *Obp83c*, *Obp99c*, *Pbprp2* (*Obp19d*) e *Pbprp5* (*Obp28a*) mostraram regulação por outros fatores relacionados à cópula. Nos nossos dados, também observamos diferença de expressão em fêmeas entre indivíduos virgens e pós-cópula para os genes *Obp19d* e *Obp56a* (Figura 6). O gene *Obp19d* apresentou quase o dobro de expressão em fêmeas virgens em relação às pós-cópula, sendo 1,97 vezes maior. Já o gene *Obp56a* possui expressão em fêmeas virgens 11 vezes maior que em fêmeas pós-cópulas. Isso pode indicar uma possível regulação desses genes pela cópula e seu envolvimento no processo reprodutivo.

Para uma investigação sobre a função e possível envolvimento das OBPs no processo reprodutivo, uma boa estratégia seria aplicar a técnica de silenciamento via interferência por RNA e ver se há alterações fenotípicas e se estas alteram o *fitness* dos indivíduos. Entretanto, OBPs são encontradas em altíssimas concentrações na linfa em torno dos dendritos dos neurônios olfatórios dos insetos, tornando os métodos de inativação de proteínas ou silenciamento gênico ineficientes, uma vez que deixam quantidades de proteína suficientes nas sensilas para normal funcionamento (Pelosi *et al.* 2006).

Ainda que esta técnica de silenciamento seja difícil de ser aplicada em OBPs, alguns estudos trazem resultados positivos. Em estudos com *Culex quinquefasciatus* (Pelletier *et al.* 2010) e *Anopheles gambiae* (Biessmann *et al.* 2010), mosquitos injetados com dsRNA para o gene *CquiOBP1* e *AgamOBP1*, respectivamente, que possui similaridade com o gene *Obp83a* de *Drosophila*, mostraram redução no número de transcritos desses genes. Em *C. quinquefasciatus* foi observada a redução da resposta da antena ao ferormônio de oviposição de mosquito (MOP – *mosquito oviposition pherormone*), escatol e indol sugerindo que este gene esteja envolvido na detecção de atrativos para oviposição. Em *A. gambiae*, as antenas de fêmeas injetadas com dsRNA não apresentavam mais resposta ao indol, indicando ser este gene um bom candidato envolvido no forrageamento das fêmeas. Uma vez que há a possibilidade das OBPs aqui estudadas estarem participando do processo reprodutivo, *Obp19d* e *Opb56a* devido à diferença de expressão entre fêmeas virgens e fêmeas pós-cópula e *Obp99c* pela sua alta expressão em machos ser de 50 a 70 vezes maior do que em fêmeas, e que genes dessa família são visados como potenciais candidatos a controle de populações, estes estudos com mosquitos nos encorajam a aplicar a técnica de silenciamento desses genes em *A. obliqua*.

3.2 – Proteínas do sistema imune

Além do sofisticado sistema olfatório, outra característica que faz dos insetos um dos grupos de maior sucesso entre os animais é sua resistência às infecções microbianas. Com imunidade inata, os insetos são a maior fonte de peptídeos antimicrobianos (AMPs) (Yi *et al.* 2014a), uma vez que desde a descoberta dessas proteínas neste grupo (Boman *et al.* 1974) mais de 150 AMPs foram identificadas e purificadas. Atacinas são AMPs que participam da resposta imune humoral e atuam na resposta contra bactérias gram-negativas e gram-positivas (Lemaitre *et al.* 1997; Verleyen *et al.* 2006; Gordon *et al.* 2008). Sua atividade antibacteriana se dá devido ao aumento da permeabilidade da membrana externa das bactérias pela interação com lipopolissacarídeos e inibe a produção de membrana externa em um nível transcricional, sem precisar entrar no citoplasma. Este aumento de permeabilidade da membrana facilita que outras moléculas como as lisozimas atinjam a membrana interna, auxiliando os peptídeos antimicrobianos (Engström *et al.* 1984; Carlsson *et al.* 1998).

A imunidade e as respostas a infecções contribuem para o *fitness* de um indivíduo. Já foi relatado em diferentes *taxa*, de vertebrados a invertebrados, que existe um dimorfismo sexual da função imune, com fêmeas apresentando, na maioria dos casos, uma maior imunidade em relação aos machos (Nunn *et al.* 2009). Isso é esperado quando se pensa em duas premissas, de que as fêmeas investem mais em longevidade do que os machos, e que os machos aumentam seu *fitness* com aumento da taxa de acasalamentos e com a longevidade das fêmeas (Bateman 1948), fatos que podem selecionar um maior investimento em imunidade nas fêmeas (Rolff *et al.* 2005). Dessa forma, machos e fêmeas diferem, geralmente, em como promovem a alocação de recursos para maximizar o *fitness*. Para macho, a melhor estratégia seria diminuir a alocação de recursos para fatores que aumentam a longevidade, como o sistema imune, para assim poder aumentar os investimentos em esforços reprodutivos e competitividade sexual; e para fêmeas o ideal seria um

balanço entre investimentos em longevidade e reprodução (Zuk & Stoher 2002; Lawniczak & Begun 2007; McKean & Nunney 2008).

Experimentos com *D. melanogaster* mostraram que o custo imunológico requerido para que haja maior sucesso na competitividade sexual e conseqüente sucesso reprodutivo em machos é alta, causando um exagerado dimorfismo sexual imunológico (McKean & Nunney 2008). Os resultados ofereceram suporte para a hipótese de aumento da competitividade em detrimento da imunidade. Machos considerados mais competitivos mostraram redução da imunidade quando comparado com os machos controles. Porém, os resultados não mostraram evidências de que esse dimorfismo é causado por seleção sexual uma vez que as fêmeas também demonstraram diminuição da imunidade. Os resultados de expressão entre as fases de vida para machos do gene *AttA* (Figura 6) tendem a concordar com essa lógica uma vez que encontramos uma queda da expressão quase pela metade em machos quando comparamos machos virgens e machos pós-cópula. A expressão em machos virgens é 1,9 vezes maior em comparação aos machos pós-cópula, indicando uma possível redução da imunidade quando o macho se encontra em período de acasalamento.

Atacinas já foram bem caracterizadas em Dipteras como *D. melanogaster* (Åsling *et al.* 1995; Dushay *et al.* 2000) e *Glossina morsitans* (Wang *et al.* 2008). Embora o gene *AttA*, retirado de nossos dados de transcriptomas, tenha apresentado maior similaridade com o gene *atacin A* de *D. melanogaster*, sua cópia supostamente homóloga de *C. capitata*, espécie mais próxima filogeneticamente de *A. obliqua*, apresentou maior similaridade com *sarcotoxin-II*, de *Sarcophaga peregrina*. O gene *sarcotoxin-II* é *atacin-like* (Ando *et al.* 1987) e, dessa forma, podemos relacionar nossos resultados com estudos sobre o gene atacina em outros organismos, o que revela que o gene *AttA* tem potencial envolvimento na competitividade dos machos no processo reprodutivo. Portanto, a queda de expressão de *AttA* após a cópula em machos apresentada por

nossos dados e sua alta expressão em machos virgens, que chega a ser 14 vezes maior do que em fêmeas virgens, tornam *AttA* um gene de interesse para estudos de silenciamento via interferência por RNA para averiguação dos efeitos desse gene no fenótipo de machos e elucidação do envolvimento desta proteína de sistema imune no processo reprodutivo.

Dessa forma, além do conhecimento que já existe sobre os genes estudados neste trabalho, muito ainda há para ser elucidado, principalmente sobre a real participação desses grupos protéicos no processo reprodutivo. Alguns genes, *AttA*, *Obp19d* e *Obp56a*, apresentaram expressão diferencial, em machos ou em fêmeas, entre as fases de virgem e pós-cópula e, além disso, há um suporte na literatura que pode indicar uma possível participação desses genes no processo reprodutivo, ou até mesmo uma possível regulação pela cópula (McGraw *et al.* 2004; Mack *et al.* 2006). Há também a alta expressão dos genes *AttA* e *Obp99c* em machos em relação às fêmeas.

Isso nos incentiva a continuar os estudos com alguns desses genes e aplicar a técnica de silenciamento via interferência por RNA por microinjeção em moscas adultas, estratégia ainda não utilizada para o gênero *Anastrepha*.

4 – Experimentos de RNAi com os genes *AttA* e *Obp99c*

Devido aos resultados de expressão dos genes candidatos, promovemos experimentos de injeção de dupla-fita de RNA em machos de *A. obliqua* virgens para os genes *AttA* e *Obp99c*. Fizemos dois experimentos independentes, sendo o primeiro deles uma tentativa de silenciar o gene *Obp99c* e na segunda tentativa optamos pelo gene *AttA*. Conferimos o efeito do silenciamento por qPCR e, após as análises estatísticas, observamos que não houve diferença significativa de expressão entre os grupos ($p > 0,05$) para os dois experimentos mediante teste *Kruskal-Wallis*. Sendo assim, as tentativas de silenciamento não foram bem sucedidas (Figura 7, Figura 8), mesmo

após as alterações da técnica como local de aplicação da injeção e aumento da dosagem que promovemos entre o primeiro e o segundo experimento.

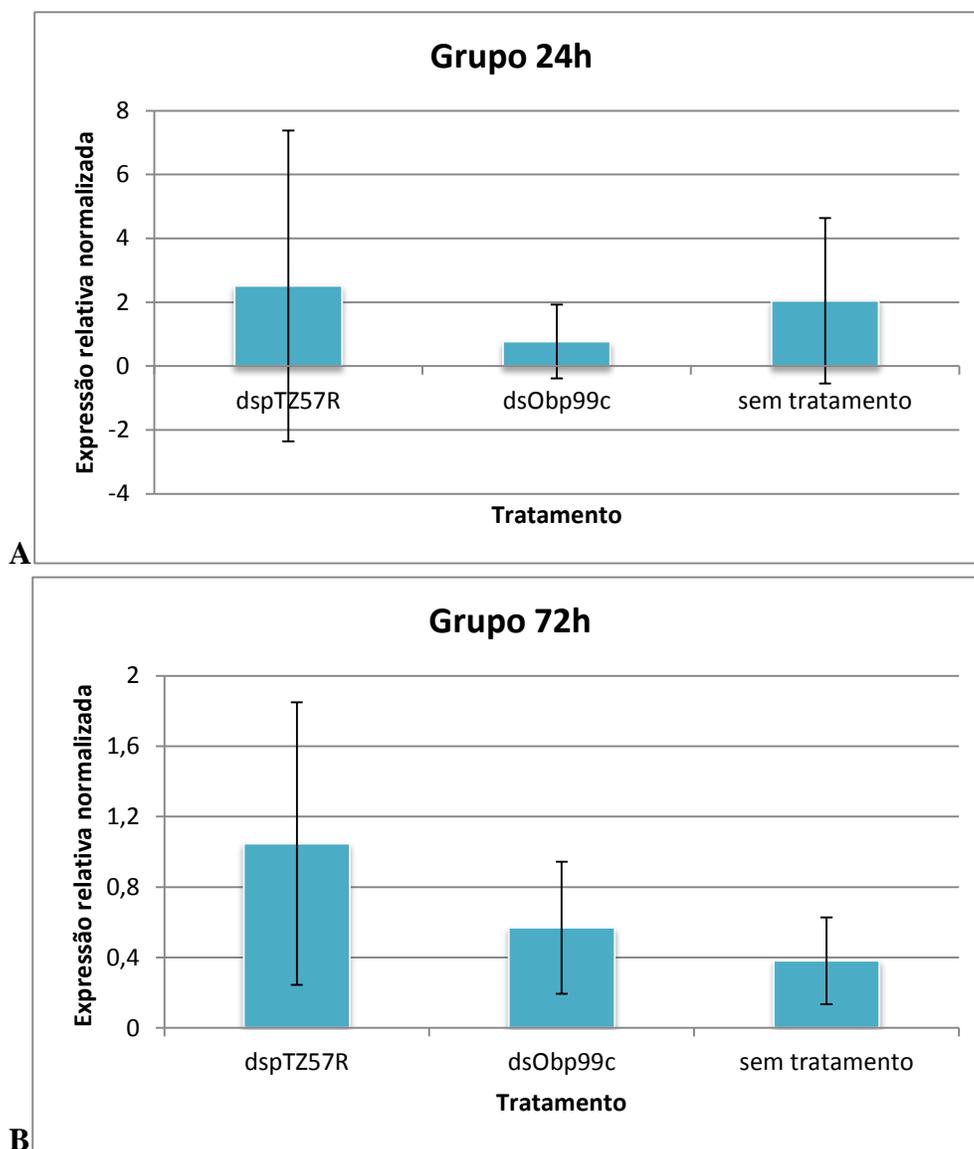


Figura 7. Expressão relativa normalizada de cada grupo do experimento de silenciamento do gene *Obp99c* em *A. obliqua*. Cada barra representa a média aritmética da expressão relativa normalizada de todos os indivíduos pertencentes a cada grupo de tratamento (os dois grupos controle e o grupo experimental). A barra de erros indica o desvio padrão calculado entre os indivíduos de cada grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). A – indivíduos coletados 24h após a injeção. B – indivíduos coletados 72h após a injeção.

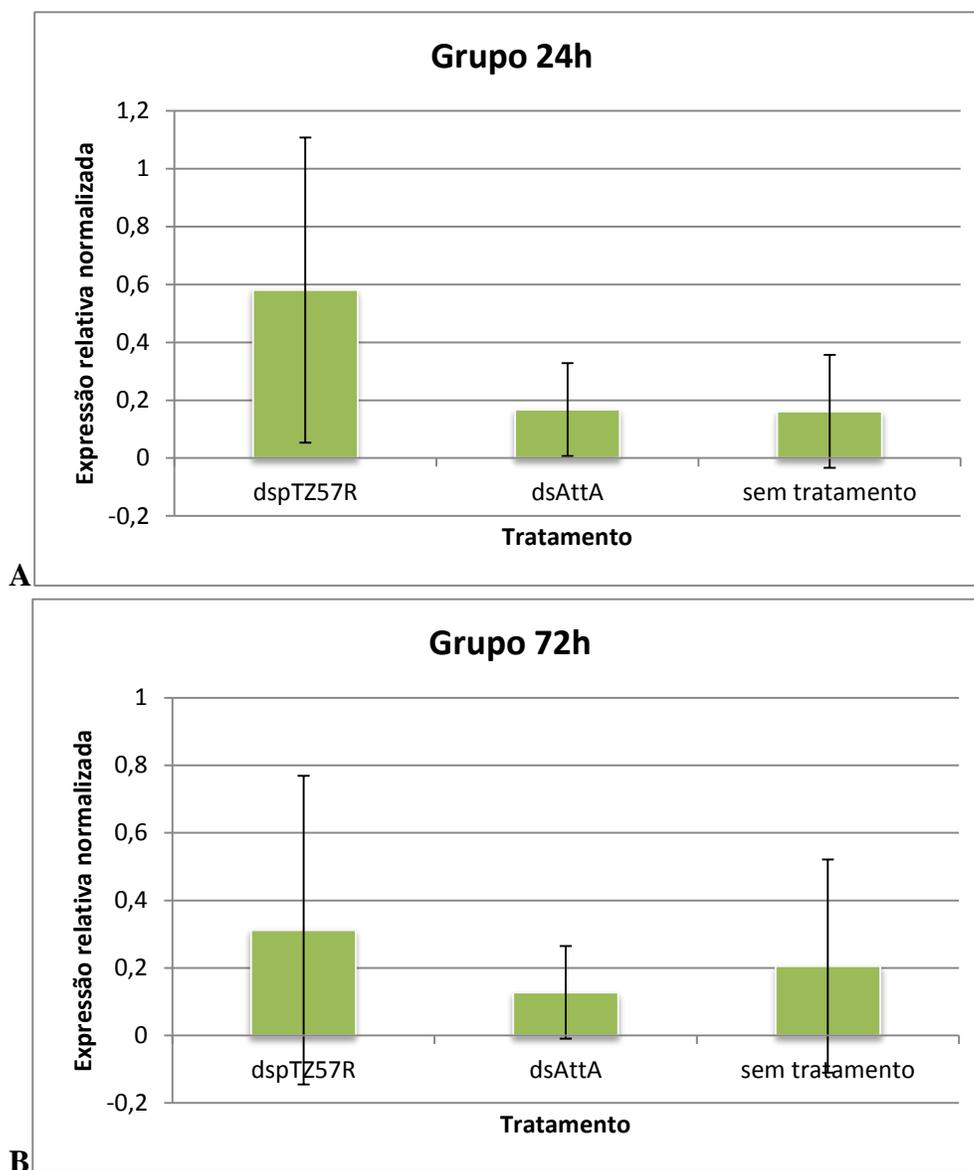


Figura 8. Expressão relativa normalizada de cada grupo do experimento de silenciamento do gene *AttA* em *A. obliqua*. Cada barra representa a média aritmética da expressão relativa normalizada de todos os indivíduos pertencentes a cada grupo de tratamento (os dois grupos controle e o grupo experimental). A barra de erros indica o desvio padrão calculado entre os indivíduos de cada grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). A – indivíduos coletados 24h após a injeção. B – indivíduos coletados 72h após a injeção.

A utilização da técnica de silenciamento via interferência por RNA em *A. obliqua* por nosso grupo de pesquisa ainda está em fase de implantação exigindo, desta forma, mais testes e padronizações dos procedimentos utilizados. Apesar de os componentes da maquinaria de silenciamento parecerem bem conservados em eucariotos, há muita divergência nos mecanismos

moleculares envolvidos que resultam na amplificação do sinal e propagação sistemática. Ao introduzirmos moléculas de dsRNA artificialmente em um organismo para estudos de silenciamento gênico *in vivo*, uma das coisas que irá determinar o sucesso da técnica é a propagação do dsRNA entre células e tecidos, tornando-se uma propagação sistêmica. O fato da propagação ser sistêmica ou não é um dos principais problemas na determinação da eficiência da técnica e é esse fato que pode estar definindo o não sucesso do silenciamento em *A. obliqua*.

O fator limitante deste sistema e que varia muito entre organismos é como esse dsRNA entra dentro da célula e se propaga de célula a célula, tecido a tecido, tornando-se sistêmico. Dessa forma, há muita diversidade de sensibilidade à técnica entre os diferentes organismos sendo que as ordens menos derivadas são mais sensíveis em relação às ordens mais derivadas, como Diptera (Bellés 2009). Muitos resultados positivos são relatados na literatura, porém eles diferem na sensibilidade a RNAi (Turner *et al.* 2006; Eleftherianos *et al.* 2007; Miller *et al.* 2008; Tomoyasu *et al.* 2008; Walshe *et al.* 2009). Além disso, resultados negativos em espécies com sensibilidade baixa a RNAi nunca é reportado, o que não significa que o número de espécies nesta situação seja pequeno. A propagação do dsRNA tornando-se sistêmico depende do gene *sid-1* que codifica uma proteína transmembrana que transporta o dsRNA para dentro da célula (Winston *et al.* 2002; van Roessel & Brand 2004; Jose & Hunter 2007).

Por enquanto, parece que insetos da ordem Diptera, na qual se insere *A. obliqua*, são deficientes de proteínas ortólogas à *sid-1*. Essas proteínas não foram encontradas em *Aedes aegypti*, *A. gambiae*, *C. quinquefasciatus* e *D. melanogaster*, sendo que em ordens como Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepdoptera e Orthoptera foram encontrados ortólogos de *sid-1* (Huvenne & Smagghe 2010). Esse poderia ser um dos fatores que fizeram com que o silenciamento de *AttA* e *Obp99c* não funcionasse em *A. obliqua*. No entanto, estudos mostram que em alguns organismos *sid-1* não é essencial para que a RNAi seja sistêmico. Para alguns insetos,

as sequências ortólogas de *sid-1* apresentaram maior similaridade com o gene *tag-130* de *C. elegans* que também se trata de uma proteína transmembrana, o que sugere processos alternativos para assimilação de RNAi pelas células (Tomoyasu *et al.* 2008). Outro fato que dá suporte à hipótese de que *sid-1* não seja essencial é que apesar de terem encontrado três ortólogos de *sid-1* em *B. mori*, RNAi não é sistêmico nesse organismo, já em algumas espécies de mosquitos, apesar de não haver ortólogos de *sid-1*, RNAi é sistêmico (Huvenne & Smagghe 2010).

Esses fatores ressaltam o fato de que, como muitas possibilidades de propagação são possíveis, as duas opções de administração de dsRNA, injeção e alimentação, devem ser testadas em *A. obliqua* antes de tirar conclusões se a propagação de RNAi é sistêmica ou não nesta espécie. Além disso, o único estudo de RNAi em *Anastrepha* utilizou injeções, porém essas foram feitas em embriões, de 60 a 80 minutos após a postura dos ovos, momento no qual as células não estão individualizadas (Schetelig *et al.* 2012), o que não gera o problema de propagação de RNAi pelo organismo para eficiência da técnica.

Em espécies nas quais a produção de organismos transgênicos é acessível, como em *D. melanogaster*, a falta da proteína *sid-1* ou qualquer outra homóloga a ela é facilmente contornável possibilitando diversos estudos que utilizam a maquinaria de RNAi (Han *et al.* 2012; Tsubouchi *et al.* 2012; Olesnický *et al.* 2014). Isso se dá pela produção de indivíduos transgênicos que possuem o sistema GAL4/UAS para ativar a transcrição de um grampo de RNA referente ao gene que se deseja silenciar, originando as moléculas de dsRNA dentro das células após o processamento promovido pela Dicer.

Optamos por começar por injeção uma vez que é uma técnica bastante utilizada com sucesso em muitos organismos, inclusive em *B. dorsalis* (Diptera, tephritidae) (Chen *et al.* 2008). Além disso, o único estudo que utiliza de silenciamento em *Anastrepha* utilizou injeções, porém

essas foram feitas em embriões (Schetelig *et al.* 2012). Os genes *AttA* e *Opb99c* não possuem expressão alta em fases do desenvolvimento (Figura 6), sendo que a injeção teve que ser feita em fase adulta. O fato do silenciamento não ter sido realizado com sucesso por injeção nos encoraja a testar a alimentação como meio de administração de dsRNA, uma vez que há exemplos de sucesso em estudos com Diptera cujo dsRNA foi oferecido na alimentação de moscas adultas (Walshe *et al.* 2009; Li *et al.* 2011a). Além disso, apesar da possível ausência do gene *Sid-1* no genoma de dípteros, outra via de assimilação de dsRNA se dá a partir de endocitose nas células S2 (*Schneider 2 cells*) em *D. melanogaster* (Saleh *et al.* 2006), sugerindo alternativas na propagação.

Dessa forma, apesar dos resultados negativos, muito ainda há que se estudar sobre a aplicação da técnica de silenciamento via interferência por RNA em moscas adultas do gênero *Anastrepha*. Padronizar esta técnica por alimentação pode ser útil para controle de populações uma vez que se pode disponibilizar dsRNA na dieta de moscas que se encontram na natureza. Essa abordagem já está sendo estudada em dípteros (Walshe *et al.* 2009), hemípteros (Araujo *et al.* 2006), himenópteros (Nunes & Simões 2009) e lepidópteros (Turner *et al.* 2006). Igualmente importante, tornar viável a aplicação desta técnica de silenciamento nos ajudará a investigar a possível atuação dos genes diferencialmente expressos no processo reprodutivo. Portanto, avanços promissores podem ser atingidos mediante silenciamento via interferência por RNA *A. obliqua*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem com as várias pesquisas realizadas em *A. obliqua* em diversas áreas do conhecimento. Estudos de expressão vêm sendo amplamente utilizado como um aliado em responder diversas questões biológicas, desde estudos evolutivos e de diversificação de espécies, por meio da expressão diferencial entre genes, tecidos e espécies, até estudos de desenvolvimento de estratégias controle de importantes pragas agrícolas ou vetores de doenças. Para *A. obliqua*, é de extremo interesse o desenvolvimento de estratégias de controle de populações, uma vez que se encontra entre as pestes agrícolas mais expressivas no Brasil, tendo a maior distribuição geográfica entre as espécies do gênero *Anastrepha* aqui estabelecidas.

Por não haver na literatura nenhuma validação de genes de referência para moscas do gênero *Anastrepha*, promovemos uma ampla procura e análise de genes candidatos à referência em estudos de expressão por qPCR em *A. obliqua*. Concluímos que os genes mais apropriados para a normalização dos dados de expressão entre diversas fases do ciclo de vida de *A. obliqua* por apresentarem alta estabilidade de expressão são os genes *rlp18*, *rps17* e *ef1a*, nesta ordem. A publicação da validação desses genes pode auxiliar trabalhos futuros tanto dentro de nosso grupo de pesquisa, no qual a técnica de qPCR será utilizada em diversos projetos já em andamento, como pra qualquer outro grupo de pesquisa que trabalhe com o gênero *Anastrepha*.

Estudar a participação de genes candidatos no processo reprodutivo pode ser uma importante via para se chegar a estratégias de controle de populações. A maioria dos genes estudados nesse trabalho apresentou alterações não significativas nos níveis de expressão entre os perfis virgem e pós-cópula. Porém, *Obp19d* e *AttA* apresentaram alterações, em fêmeas e machos, respectivamente, apresentando quase o dobro de expressão entre os perfis virgem e pós-cópula. Essas diferenças podem não apresentar qualquer significado biológico, porém não sabemos o que

pequenas alterações de expressão podem causar em um organismo. Realizamos os experimentos com moscas inteiras e não dissecadas por tecidos específicos, e isso pode estar mascarando certas alterações de expressão específicas para o tecido, causando essa homogeneidade na maioria dos níveis de expressão observados. Estimular o estudo de expressão em tecidos específicos pode ajudar a elucidar essas questões em trabalhos futuros.

Ademais, encontramos resultados interessantes para *AttA*, *Obp56a* e *Obp99c*. *Obp56a* apresentou grande diferença nos níveis de expressão entre fêmeas virgens e pós-cópula e seu grande aumento de expressão após a cópula, 11 vezes maior, pode indicar algum tipo de regulação por fatores relacionados à cópula, como suportado pela literatura, sendo válida uma melhor investigação desse gene em próximos projetos. Já os genes *AttA* e *Obp99c* possuem a expressão em machos maior quando comparado com os outros perfis, principalmente em relação às fêmeas. Isso pode ser uma informação importante, uma vez que estratégias de controle de populações visam à manipulação de machos, por apresentarem alta variância no sucesso de acasalamento, estando mais sujeitos assim a serem selecionados.

Por esse motivo, selecionamos *AttA* e *Obp99c* para aplicarmos a técnica de silenciamento por interferência por RNA, muito utilizada em estudos de função gênica, podendo revelar o real envolvimento desses genes no processo reprodutivo e seu potencial de serem aplicados a estratégias de controle. Os resultados negativos podem ter sido gerados por diversos motivos como dosagem, forma de administração, tamanho do dsRNA, mas principalmente pela falta de conhecimento de como o dsRNA se propaga de célula a célula e tecido a tecido garantindo a eficiência da técnica. Isso nos indica que mais modificações devem ser feitas até a padronização dessa técnica em *Anastrepha* no Laboratório de Genética de Populações e Evolução, que pode resultar em uma importante ferramenta para uso do grupo com objetivo de elucidar questões

biológicas a cerca das espécies de *Anastrepha*, além de providenciar mais informações sobre o processo de silenciamento em Diptera.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allinghi, A., Gramajo, C., Willink, E. e Vilardi, J. (2007). Induction of sterility in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by gamma radiation. *Florida Entomologist*, 90: 96-102.
- Aluja, M. (1994). Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annual Review of Entomology*, 39: 155-178.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L. e Orntoft, T. F. (2004). Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer Data Sets. *Cancer Research*, 64: 5245-5250.
- Andersson, M. e Iwasa, Y. (1996). Sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution*, 11: 53-58.
- Ando, K., Okada, M. e Natori, S. (1987). Purification of *sarcotoxin II*, antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. *Biochemistry*, 26: 226-230.
- Andres, J. A., Maroja, L. S. e Harrison, R. G. (2008). Searching for candidate speciation genes using a proteomic approach: seminal proteins in field crickets. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275: 1975-1983.
- Araujo, R. N., Santos, A., Pinto, F. S., Gontijo, N. F., Lehane, M. J. e Pereira, M. H. (2006). RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 683-693.
- Åsling, B., Dushay, M. S. e Hultmark, D. (1995). Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the *Attacin A* gene and the evolution of attacin-like proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25: 511-518.
- Baranowski, R., Glenn, H. e Sivinski, J. (1993). Biological-control of the caribbean fruit-fly (Diptera, Tephritidae). *Florida Entomologist*, 76: 245-251.
- Barlow, J. J., Mathias, A. P., Williamson, R. e Gammack, D. B. (1963). A simple method for the quantitative isolation of undegraded high molecular weight ribonucleic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 13: 61-66.
- Bartel, David P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116[2], 281-297. 1-23-2004.
- Ref Type: Abstract
- Bateman, A. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2: 349-368.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431: 356-363.
- Bellés, X. (2009). Beyond *Drosophila*: RNAi *in vivo* and functional genomics in insects. *Annual Review of Entomology*, 55: 111-128.
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., Hall, K. P., Evers, D. J., Barnes, C. L. et al. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456: 53-59.
- Benton, R. (2006). On the ORigin of smell: odorant receptors in insects. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63: 1579-1585.
- Biessmann, H., Andronopoulou, E., Biessmann, M. R., Douris, V., Dimitratos, S. D., Eliopoulos, E., Guerin, P. M., Iatrou, K., Justice, R. W. et al. (2010). The *Anopheles gambiae* Odorant Binding Protein 1 (AgamOBP1) mediates indole recognition in the antennae of female mosquitoes. *PLoS ONE*, 5: e9471.
- Bjelis, Mario, Ljubetic, Visnja, and Novosel, Nevenka. Control of Medfly by SIT in the nereva river Valley. 255-259. 2006. Salvador, Brasil, Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance.

Ref Type: Conference Proceeding

- Blay, S. e Yuval, B. (1997). Nutricional correlates of reproductive success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Animal Behaviour*, 54: 59-66.
- Boake, C. R. B. (2000). Flying apart: mating behavior and speciation. *BioScience*, 50: 501-508.
- Bohbot, J. e Vogt, R. G. (2005). Antennal expressed genes of the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti* L.); characterization of odorant-binding protein 10 and takeout. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 961-979.
- Boman, H. G., Nilsson-Faye, I., Paul, K. e Rasmuson, T. (1974). Insect immunity I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Infection and Immunity*, 10: 136-145.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 169-193.
- Bustin, S. A. (2010). Why the need for qPCR publication guidelines? - The case for MIQE. *Methods*, 50: 217-226.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W. et al. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55: 611-622.
- Bustin, S. A. e Nolan, T. (2004). Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *J. Biomol Tech*, 15: 155-166.
- Calcagno, G. E., Manso, F. e Vilardi, J. C. (2002). Comparison of mating performance of Medfly (Diptera, Tephritidae) genetic sexing and wild type strains: field cage and video recording experiments. *Florida Entomologist*, 85: 41-50.
- Cancino, J., Montoya, P., Barrera, J., Aluja, M. e Liedo, P. (2014). Parasitism by *Coptera haywardi* and *Diachasmimorpha longicaudata* on *Anastrepha* flies with different fruits under laboratory and field cage conditions. *BioControl*, 59: 287-295.
- Cardoso, G. A., Matioli, C. C., Azeredo-Espin, A. M. L. e Torres, T. T. (2014). Selection and validation of reference genes for functional studies in the Calliphoridae family. *Journal of Insect Science*, 14: 1-15.
- Carlsson, A., Nyström, T., de Cock, H. e Bennich, H. (1998). *Attacin* - an insect immune protein - binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer-membrane protein synthesis. *Microbiology*, 144: 2179-2188.
- Carvalho, P. G. Efeitos do nitrogênio e no metabolismo de frutanos em *Vernonia* herbácea. 2005. ESALQ.
- Ref Type: Thesis/Dissertation
- Carvalho, R.S., Nascimento, A.S. e Matrangolo, W.J.R. (2000). Controle biológico. in Malavasi, A. e Zucchi, R. A. (eds.) *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Ribeirão Preto: Holos Editora.
- Chao, W. S., Dogramaci, M., Foley, M. E., Horvath, D. P. e Anderson, J. V. (2012a). Selection and validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis in leafy spurge (*Euphorbia esula*). *PLoS ONE*, 7: e42839.
- Chao, W. S., Dogramaci, M., Foley, M. E., Horvath, D. P. e Anderson, J. V. (2012b). Selection and validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis in leafy spurge *Euphorbia esula*. *PLoS ONE*, 7: e42839.
- Chen, P. S., Stumm-Zollinger, E., Aigaki, T., Balmer, J., Bienz, M. e Böhlen, P. (1988). A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female *D. melanogaster*. *Cell*, 54: 291-298.
- Chen, S. L., Dai, S. M., Lu, K. H. e Chang, C. (2008). Female-specific *doublesex* dsRNA interrupts yolk protein gene expression and reproductive ability in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 155-165.

- Cheng, D., Zhang, Z., He, X. e Liang, G. (2013). Validation of reference genes in *Solenopsis invicta* in different developmental stages, castes and tissues. *PLoS ONE*, 8: e57718.
- Chomczynski, P. e Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162: 156-159.
- Cicero, L., Sivinski, J. e Aluja, M. (2012). Effect of host diet and adult parasitoid diet on egg load dynamics and egg size of braconid parasitoids attacking *Anastrepha ludens*. *Physiological Entomology*, 37: 177-184.
- Clark, N. L., Findlay, G. D., Yi, X., MacCoss, M. J. e Swanson, W. J. (2007). Duplication and selection on abalone sperm lysin in an allopatric population. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 2081-2090.
- Clyne, P. J., Warr, C. G., Freeman, M. R., Lessing, D., Kim, J. e Carlson, J. R. (1999). A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron*, 22: 327-338.
- Coggins, S. A., Estévez-Lao, T. Y. e Hillyer, J. F. (2012). Increased survivorship following bacterial infection by the mosquito *Aedes aegypti* as compared to *Anopheles gambiae* correlates with increased transcriptional induction of antimicrobial peptides. *Developmental & Comparative Immunology*, 37: 390-401.
- Cook, P. E., Hugo, L. E., Iturbe-Ormaetxe, I., Williams, C. R., Chenoweth, S. F., Ritchie, S. A., Ryan, P. A., Kay, B. H., Blows, M. W. et al. (2006). The use of transcriptional profiles to predict adult mosquito age under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 18060-18065.
- Dallas-Yang, Q., Jiang, G. e Sladek, F. M. (1998). Avoiding false positives in colony PCR. *Biotechniques*, 24: 580-582.
- DeBach, P. (1964). *Biological control of insects pests and weeds*. London: Chapman & Hall Ltd.
- Duarte, A.L. e Malavasi, A. (2000). Tratamentos Quarentenários. in Malavasi, A. e Zucchi, R. A. (eds.) *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Ribeirão Preto: Holos Editora.
- Dushay, M. S., Roethle, J. B., Chaverri, J. M., Dulek, D. E., Syed, S. K., Kitami, T. e Eldon, E. D. (2000). Two attacin antibacterial genes of *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 246: 49-57.
- Eleftherianos, I., Gökçen, F., Felföldi, G., Millichap, P. J., Trenczek, T. E., French-Constant, R. H. e Reynolds, S. E. (2007). The immunoglobulin family protein *Hemolin* mediates cellular immune responses to bacteria in the insect *Manduca sexta*. *Cellular Microbiology*, 9: 1137-1147.
- Engström, P., Carlsson, A., Engström, A., Tao, Z. J. e Bennich, H. (1984). The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 3: 3347-3351.
- Fernandes, F. Análise multilocus de parâmetros populacionais, evolução molecular e diferenciação em espécies de moscas-das-frutas do grupo *fraterculus* (Diptera, Tephritidae). 2010. Universidade federal de São Carlos.
- Ref Type: Thesis/Dissertation
- Findlay, G. D., Yi, X., MacCoss, M. J. e Swanson, W. J. (2008). Proteomics reveals novel *Drosophila* seminal fluid proteins transferred at mating. *PLoS Biol*, 6: e178.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. e Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-811.
- Flores, S., Montoya, P., Toledo, J., Enkerlin, W. e Liedo, P. (2014). Estimation of populations and sterility induction in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) fruit flies. *Journal of Economic Entomology*, 107: 1502-1507.
- Fu, L., Li, Z. H., Huang, G. S., Wu, X. X., Ni, W. L. e Qüi, W. W. (2014). The current and future potential geographic range of West Indian fruit fly, *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). *Insect Science*, 21: 234-244.

- Gillott, C. (2003). Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annual Review of Entomology*, 48: 163-184.
- Gonçalves, V. R., I. Sobrinho Jr., W. Malago Jr, F. H. Silva and R. A. de Brito. 2012. Transcriptome analysis of female reproductive tissues and molecular evolutionary studies of eggshell proteins in *Anastrepha fraterculus* fruit flies. *Frontiers in Genetics (In press)*
- Gong, P., Epton, M. J., Fu, G., Scaife, S., Hiscox, A., Condon, K. C., Condon, G. C., Morrison, N. I., Kelly, D. W. et al. (2005). A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. *Nat Biotech*, 23: 453-456.
- Gordon, M. D., Ayres, J. S., Schneider, D. S. e Nusse, R. (2008). Pathogenesis of listeria-infected *Drosophila* wntD mutants is associated with elevated levels of the novel immunity gene edin. *PLoS Pathogens*, 4: e1000111.
- Haerty, W., Jagadeeshan, S., Kulathinal, R. J., Wong, A., Ravi Ram, K., Sirot, L. K., Levesque, L., Artieri, C. G., Wolfner, M. F. et al. (2007). Evolution in the fast lane: rapidly evolving sex-related genes in *Drosophila*. *Genetics*, 177: 1321-1335.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. e Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *The EMBO Journal*, 21: 4671-4679.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. e Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404: 293-296.
- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. e Hannon, G. J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 293: 1146-1150.
- Han, C., Wang, D., Soba, P., Zhu, S., Lin, X., Jan, L. e Jan, Y. N. (2012). Integrins regulate repulsion-mediated dendritic patterning of *Drosophila* sensory neurons by restricting dendrites in a 2D space. *Neuron*, 73: 64-78.
- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature*, 418: 244-251.
- Heath, R. R., Epsky, N. D., Dueben, B. D., Guzman, A., and Andrade, L. E. Gamma radiation effect on production of four pheromonal components of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 87[4], 904-909. 8-1-1994.
- Ref Type: Abstract
- Heifetz, Y., Tram, U. e Wolfner, M. F. (2001). Male contributions to egg production: the role of accessory gland products and sperm in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268: 175-180.
- Heifetz, Y., Lung, O., Frongillo, J. e Wolfner, M. F. (2000). The *Drosophila* seminal fluid protein Acp26Aa stimulates release of oocytes by the ovary. *Current Biology*, 10: 99-102.
- Hekmat-Scafe, D. S., Scafe, C. R., McKinney, A. J. e Tanouye, M. A. (2002). Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 12: 1357-1369.
- Hittinger, C. T. e Carroll, S. B. (2007). Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. *Nature*, 449: 677-681.
- Huang, X. e Madan, A. (1999). CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Research*, 9: 868-877.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. e Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*, 6: 279-284.
- Hugo, L. E., Cook, P. E., Johnson, P. H., Rapley, L. P., Kay, B. H., Ryan, P. A., Ritchie, S. A. e O'Neill, S. L. (2010). Field validation of a transcriptional assay for the prediction of age of uncaged *Aedes aegypti* mosquitoes in northern Australia. *PLoS Negl Trop Dis*, 4: e608.
- Huvenne, H. e Smagghe, G. (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *Journal of Insect Physiology*, 56: 227-235.

- Immonen, E. e Ritchie, M. G. (2012). The genomic response to courtship song stimulation in female *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279: 1359-1365.
- Jacob, F., Guertler, R., Naim, S., Nixdorf, S., Fedier, A., Hacker, N. F. e Heinzelmann-Schwarz, V. (2013). Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines. *PLoS ONE*, 8: e59180.
- Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. e Gibson, T. J. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*, 23: 403-405.
- Jin, L., Walker, A. S., Fu, G., Harvey-Samuel, T., Dafa'alla, T., Miles, A., Marubbi, T., Granville, D., Humphrey-Jones, N. et al. (2013). Engineered female-specific lethality for control of pest Lepidoptera. *ACS Synthetic Biology*, 2: 160-166.
- Jose, A. M. e Hunter, C. P. (2007). Transport of sequence-specific RNA interference information between cells. *Annual Review of Genetics*, 41: 305-330.
- Juan-Blasco, M., Sabater-Muñoz, B., Argilés, R., Jacas, J. A., Castañera, P. e Urbaneja, A. (2013). Molecular tools for sterile sperm detection to monitor *Ceratitis capitata* populations under SIT programmes. *Pest Management Science*, 69: 857-864.
- Kaspi, R. e Yuval, B. (2000). Post-terenal protein feeding improves sexual competitiveness but reduces longevity of mass-reared sterile male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93: 949-955.
- Kelleher, E. S. e Pennington, J. E. (2009). Protease gene duplication and proteolytic activity in *Drosophila* female reproductive tracts. *Molecular Biology and Evolution*, 26: 2125-2134.
- Kelleher, E. S., Swanson, W. J. e Markow, T. A. (2007). Gene duplication and adaptive evolution of digestive proteases in *Drosophila arizonae* female reproductive tracts. *PLoS Genet*, 3: e148.
- Knipling, E. F. (1955). Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, 48: 459-462.
- Lagarde, A., Spinelli, S., Tegoni, M., He, X., Field, L., Zhou, J. J. e Cambillau, C. (2011). The crystal structure of Odorant Binding Protein 7 from *Anopheles gambiae* exhibits an outstanding adaptability of its binding site. *Journal of Molecular Biology*, 414: 401-412.
- Lawniczak, M. K. N., Barnes, A. I., Linklater, J. R., Boone, J. M., Wigby, S. e Chapman, T. (2006). Mating and immunity in invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution*, 22: 48-55.
- Lawniczak, M. K. N. e Begun, D. J. (2007). Molecular population genetics of female-expressed mating-induced serine proteases in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1944-1951.
- Leal, W. S. (2013). Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58: 373-391.
- Leal, W. S., Barbosa, R. M. R., Xu, W., Ishida, Y., Syed, Z., Latte, N., Chen, A. M., Morgan, T. I., Cornel, A. J. et al. (2008). Reverse and conventional chemical ecology approaches for the development of oviposition attractants for *Culex* mosquitoes. *PLoS ONE*, 3: e3045.
- Lemaitre, B., Reichhart, J. M. e Hoffmann, J. A. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 14614-14619.
- Lew, T. A. e Rice, W. R. (2005). Natural selection favours harmful male *Drosophila melanogaster* that reduce the survival of females. *Evolutionary ecology research*, 7: 633-641.
- Li, F., Wantuch, H. A., Linger, R. J., Belikoff, E. J. e Scott, M. J. (2014). Transgenic sexing system for genetic control of the Australian sheep blow fly *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 51: 80-88.
- Li, S., Picimbon, J. F., Ji, S., Kan, Y., Chuanling, Q., Zhou, J. J. e Pelosi, P. (2008). Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372: 464-468.

- Li, X., Zhang, M. e Zhang, H. (2011a). RNA Interference of Four Genes in Adult *Bactrocera dorsalis* by Feeding Their dsRNAs. *PLoS ONE*, 6: e17788.
- Li, X., Zhang, M. e Zhang, H. (2011b). RNA Interference of Four Genes in Adult *Bactrocera dorsalis* by Feeding Their dsRNAs. *PLoS ONE*, 6: e17788.
- Lis, J. T. e Schleif, R. (1975). Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic Acids Research*, 2: 383-390.
- Livak, K. J. e Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, 25: 402-408.
- Long, T., Pischedda, A., Nichols, R. e Rice, W. R. (2010). The timing of mating influences reproductive success in *Drosophila melanogaster*: implications for sexual conflict. *Journal of Evolutionary Biology*, 23: 1024-1032.
- Lux, S. A., Vilardi, J. C., Liedo, P., Gaggli, K., Calcagno, G. E., Munyiri, F. N., Vera, M. T. e Manso, F. (2002). Effects of irradiation on the courtship behaviour of Medfly (Diptera, Tephritidae) mass reared for the Sterile Insect Technique. *Florida Entomologist*, 85: 102-112.
- Mack, P. D., Kapelnikov, A., Heifetz, Y. e Bender, M. (2006). Mating-responsive genes in reproductive tissues of female *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 10358-10363.
- Malacrida, A. R., Gomulski, L. M., Bonizzoni, M., Bertin, S., Gasperi, G. e Guglielmino, C. R. (2007). Globalization and fruitfly invasion and expansion: the medfly paradigm. *Genetica*, 131: 1-9.
- Malavasi, A., Zucchi, R. A. e Sugiyama, R. L. (2000). Biogeografia. in Malavasi, A. e Zucchi, R. A. (eds.) *Moscas-das-drutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Ribeirão Preto: Holos Editora.
- Martin, O. Y. e Hosken, D. J. (2003). The evolution of reproductive isolation through sexual conflict. *Nature*, 423: 979-982.
- Martinez, D. A. e Nelson, M. A. (2010). The Next Generation becomes the now generation. *PLoS Genet*, 6: e1000906.
- Massonnet-Bruneel, B., Corre-Catelin, N., Lacroix, R., Lees, R. S., Hoang, K. P., Nimmo, D., Alpey, L. e Reiter, P. (2013). Fitness of transgenic mosquito *Aedes aegypti* males carrying a dominant lethal genetic system. *PLoS ONE*, 8: e62711.
- Matsuo, T., Sugaya, S., Yasukawa, J., Aigaki, T. e Fuyama, Y. (2007). Odorant-binding proteins OBP57d and OBP57e affect taste perception and host-plant preference in *Drosophila sechellia*. *PLoS Biol*, 5: e118.
- McBride, C. S. (2007). Rapid evolution of smell and taste receptor genes during host specialization in *Drosophila sechellia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 4996-5001.
- McGraw, L. A., Gibson, G., Clark, A. G. e Wolfner, M. F. (2004). Genes regulated by mating, sperm, or seminal proteins in mated female *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, 14: 1509-1514.
- McInnis, D. O., Shelly, T. E. e Komatsu, J. (2002). Improving male mating competitiveness and survival in the field for Medfly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) SIT programs. *Genetica*, 116: 117-124.
- McKean, K. A. e Nunnery, L. (2008). Sexual selection and immune function in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 62: 386-400.
- McManus, M. T. e Sharp, P. A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*, 3: 737-747.
- Meister, G. e Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431: 343-349.
- Miller, S., Brown, S. e Tomoyasu, Y. (2008). Larval RNAi in *Drosophila*? *Dev Genes Evol*, 218: 505-510.
- Miyatake, T., Chapman, T. e Partridge, L. (1999). Mating-induced inhibition of remating in female Mediterranean fruit flies *Ceratitis capitata*. *Journal of Insect Physiology*, 45: 1021-1028.

- Montoya, P., Liedo, P., Benrey, B., Cancino, J., Barrera, J. F., Sivinski, J. e Aluja, M. (2000). Biological control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control*, 18: 216-224.
- Mutti, N. S., Park, Y., Reese, J. C. e Reeck, G. R. (2006). RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Science*, 6.
- Neubaum, D. M. e Wolfner, M. F. (1999). Mated *Drosophila melanogaster* females require a seminal fluid protein, Acp36DE, to store sperm efficiently. *Genetics*, 153: 845-857.
- Noh, M. Y., Beeman, R. W. e Arakane, Y. (2012). RNAi-based functional genomics in *Tribolium castaneum* and possible application for controlling insect pests. *Entomological Research*, 42: 1-10.
- Nunes, F. M. F. e Simões, Z. L. P. (2009). A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 157-160.
- Núñez-Campero, S. R., Aluja, M., Rull, J. e Ovruski, S. M. (2014). Comparative demography of three neotropical larval-prepupal parasitoid species associated with *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 69: 8-17.
- Nunn, C. L., Lindenfors, P., Pursall, E. R. e Rolff, J. (2009). On sexual dimorphism in immune function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364: 61-69.
- Ogaugwu, C. E., Schetelig, M. F. e Wimmer, E. A. (2013). Transgenic sexing system for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) based on female-specific embryonic lethality. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43: 1-8.
- Ohta, S., Seto, Y., Tamura, K., Ishikawa, Y. e Matsuo, T. (2014). Identification of odorant-binding protein genes expressed in the antennae and the legs of the onion fly, *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae). *Appl Entomol Zool*, 49: 89-95.
- Olesnick, E. C., Killian, D. J., Garcia, E., Morton, M. C., Rathjen, A. R., Sola, I. E. e Gavis, E. R. (2014). Extensive use of RNA-binding proteins in *Drosophila* sensory neuron dendrite morphogenesis. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 4: 297-306.
- Orozco, D., Domínguez, J., Reyes, J., Villaseñor, A. e Gutiérrez, J. M. (2004). SIT and biological control of *Anastrepha* fruit flies in Mexico. Irene: Isteg Scientific Publications.
- Ovesná, J., Kucera, L., Vaculová, K., Strymlová, K., Svobodová, I. e Milella, L. (2012). Validation of the β -*amy1* transcription profiling assay and selection of reference genes suited for a RT-qPCR assay in developing barley Caryopsis. *PLoS ONE*, 7: e41886.
- Ovruski, S. M., Bezdjian, L. P., Van Nieuwenhove, G. A., Albornoz-Medina, P. e Schliserman, P. (2011). Host preference by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) reared on larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 94: 195-200.
- Panhuis, T. M., Butlin, R., Zuk, M. e Tregenza, T. (2001). Sexual selection and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 16: 364-371.
- Pelletier, J., Guidolin, A., Syed, Z., Cornel, A. J. e Leal, W. (2010). Knockdown of a mosquito odorant-binding protein involved in the sensitive detection of oviposition attractants. *J Chem Ecol*, 36: 245-248.
- Pelosi, P., Zhou, J. J., Ban, L. P. e Calvello, M. (2006). Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63: 1658-1676.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: e45.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. e Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26: 509-515.

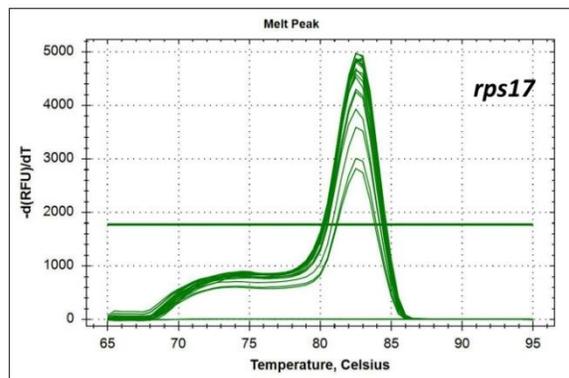
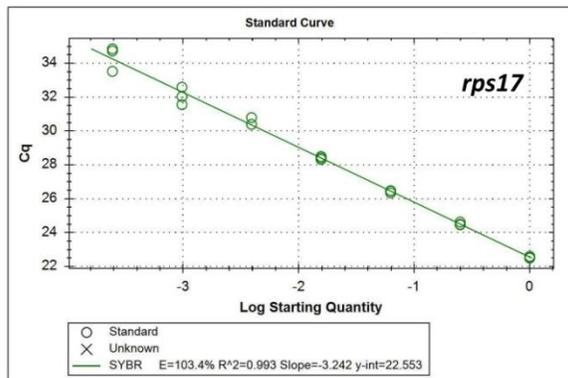
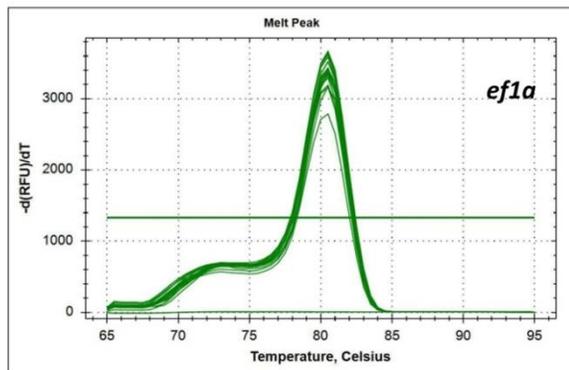
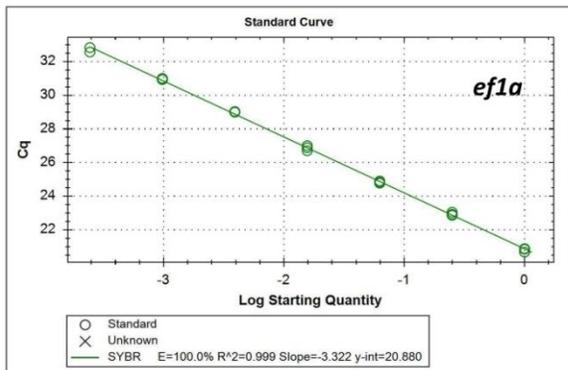
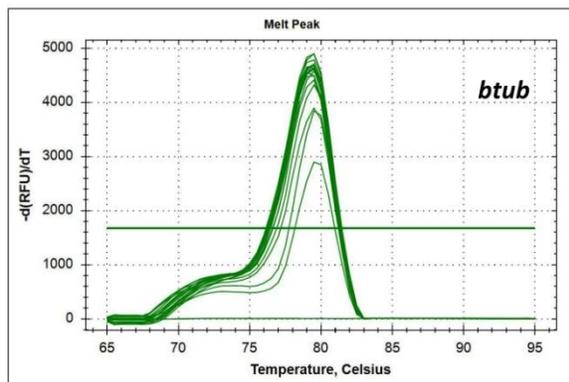
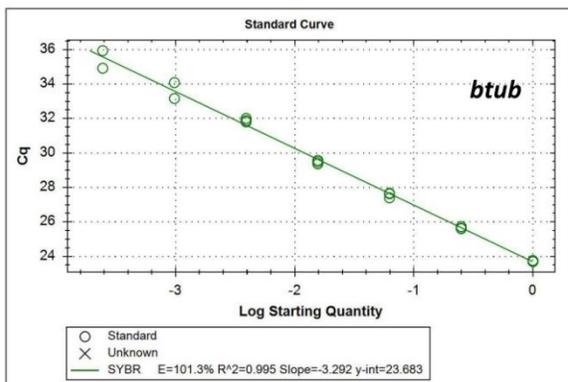
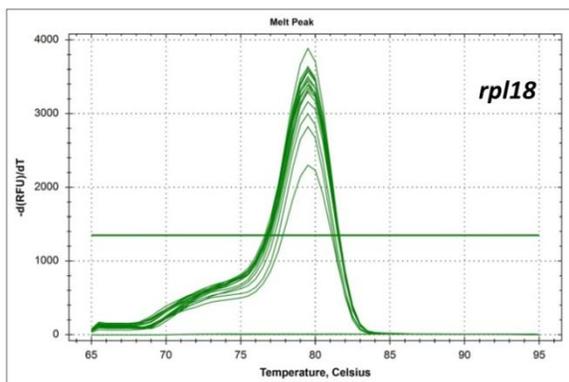
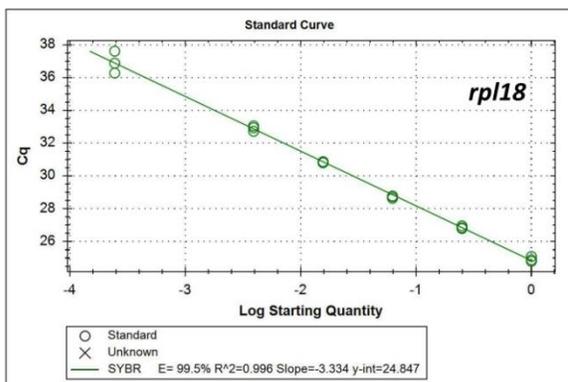
- Phuc, H., Andreasen, M., Burton, R., Vass, C., Epton, M., Pape, G., Fu, G., Condon, K., Scaife, S. et al. (2007). Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biology*, 5: 11.
- Pilpel, N., Nezer, I., Applebaum, S. W. e Heifetz, Y. (2008). Mating-increases trypsin in female *Drosophila* hemolymph. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 320-330.
- Price, D. R. G. e Gatehouse, J. A. (2008). RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotechnology*, 26: 393-400.
- Prout, T. e Clark, A. G. (2000). Seminal fluid causes temporarily reduced egg hatch in previously mated females. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267: 201-203.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W. e Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313: 856-862.
- Ramm, S. A., Oliver, P. L., Ponting, C. P., Stockley, P. e Emes, R. D. (2008). Sexual selection and the adaptive evolution of mammalian ejaculate proteins. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 207-219.
- Raphael, K. A., Whyard, S., Shearman, D., An, X. e Frommer, M. (2004). *Bactrocera tryoni* and closely related pest tephritids – molecular analysis and prospects for transgenic control strategies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 167-176.
- Rice, W. R. (1996). Sexually antagonistic male adaptation triggered by experimental arrest of female evolution. *Nature*, 381: 232-234.
- Rolff, J., Armitage, S. A. O. e Coltman, D. W. (2005). Genetic constrains and sexual dimorphism in immune defense. *Evolution*, 59: 1844-1850.
- Ross, J., Jiang, H., Kanost, M. R. e Wang, Y. (2003). Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. *Gene*, 304: 117-131.
- Saccone, G., Pane, A., Simone, A., Salvemini, M., Milano, A., Annunziata, L., Mauro, U. e Polito, L. C. (2007). New sexing strains for mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*: transforming females into males Area-Wide Control of Insect Pests. in Vreysen, M. J. B., Robinson, A. S. e Hendrichs, J. (eds.) *Area-wide control of insects pests*. Springer Netherlands.
- Saleh, M. C., van Rij, R. P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P. H. e Andino, R. (2006). The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nat Cell Biol*, 8: 793-802.
- Schetelig, M. F., Scolari, F., Handler, Alfred M., Gasperi, G., and Wimmer, E. A. New genetic tools for Improving SIT in *Ceratitidis capitata*: embryonic lethality and sperm marking. 299-305. 2006. Salvador, Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance.
- Ref Type: Conference Proceeding
- Schetelig, M. F. e Handler, A. M. (2012). A transgenic embryonic sexing system for *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42: 790-795.
- Schetelig, M. F., Milano, A., Saccone, G. e Handler, A. M. (2012). Male only progeny in *Anastrepha suspensa* by RNAi-induced sex reversion of chromosomal females. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42: 51-57.
- Schliserman, P., Van Nieuwenhove, G. A., Bezdjian, L. P., Albornoz-Medina, P., Escobar, L. I., Buonocore Biancheri, M. J., Altamirano, J., Aluja, M. e Ovruski, S. M. (2013). Bionomics of *Opius bellus* (Hymenoptera: Braconidae), an endoparasitoid of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in fruit-growing areas of Northwestern Argentina. *Biocontrol Science and Technology*, 24: 375-388.
- Scolari, F., Schetelig, M. F., Gabrieli, P., Siciliano, P., Gomulski, L. M., Karam, N., Wimmer, E. A., Malacrida, A. R. e Gasperi, G. (2008). Insect transgenesis applied to tephritid pest control. *Journal of Applied Entomology*, 132: 820-831.
- Shelly, T. E. e Kennelly, S. (2002). Influence of male diet on male mating success and longevity and female remating in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *Florida Entomologist*, 85: 572-579.

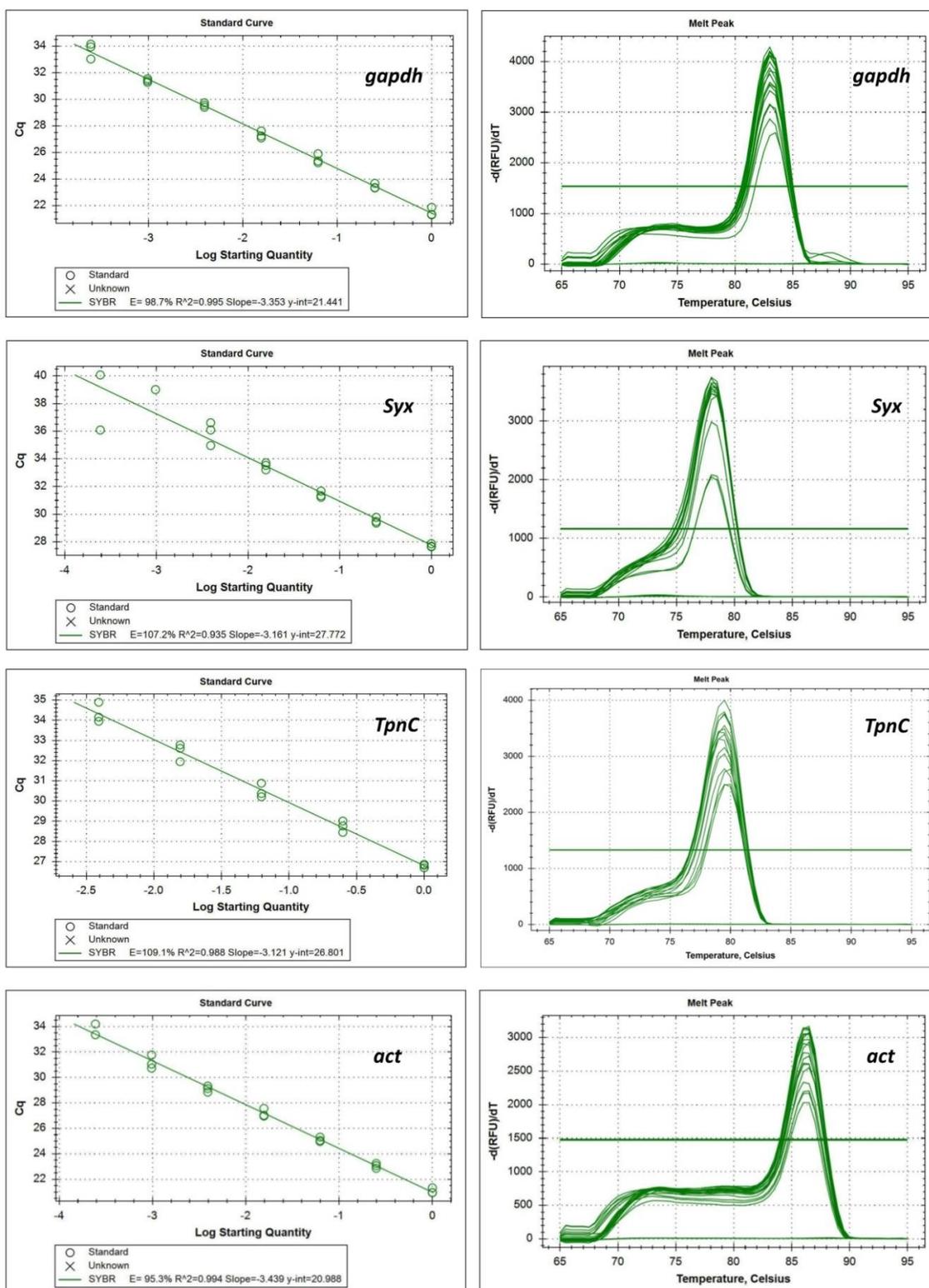
- Shelly, T. E. e McInnis, D. O. (2003). Influence of adult diet on the mating success and survival of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) from two mass-rearing strains on field-cage host trees. *Florida Entomologist*, 86: 340-344.
- Shelly, T. E., McInnis, D. O., Rodd, C., Edu, J. e Pahio, E. (2007). Sterile Insect Technique and Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): assessing the utility of aromatherapy in a Hawaiian coffee field. *Journal of Economic Entomology*, 100: 273-282.
- Shin, D., Jin, L., Lobo, N. F. e Severson, D. W. (2011). Transcript profiling of the meiotic drive phenotype in testis of *Aedes aegypti* using suppressive subtractive hybridization. *Journal of Insect Physiology*, 57: 1220-1226.
- Silva, J. G., Dutra, V. S., Santos, M. S., Silva, N. M. O., Vidal, D. B., Nink, R. A., Guimarães, J. A. e Araujo, E. L. (2010). Diversity of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) and associated braconid parasitoids from native and exotic hosts in southeastern Bahia, Brazil. *Environmental Entomology*, 39: 1457-1465.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J. e Thein, S. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7: 33.
- Sivinski, J. M., Calkins, C. O., Baranowski, R., Harris, D., Brambila, J., Diaz, J., Burns, R. E., Holler, T. e Dodson, G. (1996). Suppression of a Caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa* (Loew) Diptera: Tephritidae) population through augmented releases of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control*, 6: 177-185.
- Snook, R. R., Brustle, L. e Slate, J. (2009). A test and review of the role of effective population size on experimental sexual selection patterns. *Evolution*, 63: 1923-1933.
- Sobrinho, I. S. e de Brito, R. (2010). Evidence for positive selection in the gene *fruitless* in *Anastrepha* fruit flies. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 293.
- Sobrinho, I. S. e de Brito, R. A. (2012). Positive and purifying selection influence the evolution of *Doublesex* in the *Anastrepha fraterculus* species group. *PLoS ONE*, 7: e33446.
- Solferini, V. N. e Morgante, J. S. (1987). Karyotype study of eight species of *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae). *Caryologia*, 40: 229-241.
- Soller, M., Bownes, M. e Kubli, E. (1999). Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females. *Developmental Biology*, 208: 337-351.
- Swanson, W. J. e Vacquier, V. D. (2002). The rapid evolution of reproductive proteins. *Nat Rev Genet*, 3: 137-144.
- Swanson, W. J., Wong, A., Wolfner, M. F. e Aquadro, C. F. (2004). Evolutionary expressed sequence tag analysis of *Drosophila* female reproductive tracts identifies genes subjected to positive selection. *Genetics*, 168: 1457-1465.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M. e Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR – Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50: S1-S5.
- Thavamanikumar, S., Southerton, S. e Thumma, B. (2014). RNA-Seq Using Two Populations Reveals Genes and Alleles Controlling Wood Traits and Growth in *Eucalyptus nitens*. *PLoS ONE*, 9: e101104.
- Thomas, D. D., Donnelly, C. A., Wood, R. J. e Alphey, L. S. (2000). Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science*, 287: 2474-2476.
- Tomoyasu, Y., Miller, S. C., Tomita, S., Schoppmeier, M., Grossmann, D. e Bucher, G. (2008). Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology*, 9: R10.
- Tram, U. e Wolfner, M. F. (1999). Male seminal fluid proteins are essential for sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 153: 837-844.
- Tsitsanou, K. E., Thireou, T., Drakou, C. E., Koussis, K., Keramioti, M. V., Leonidas, D. D., Eliopoulos, E., Iatrou, K. e Zographos, S. E. (2012). *Anopheles gambiae* odorant binding protein crystal complex with

- the synthetic repellent DEET: implications for structure-based design of novel mosquito repellents. *Cell. Mol. Life Sci.*, 69: 283-297.
- Tsubouchi, A., Caldwell, J. C. e Tracey, W. D. (2012). Dendritic filopodia, ripped pocket, NOMPC, and NMDARs contribute to the sense of touch in *Drosophila* larvae. *Current Biology*, 22: 2124-2134.
- Turner, C. T., Davy, M. W., MacDiarmid, R. M., Plummer, K. M., Birch, N. P. e Newcomb, R. D. (2006). RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology*, 15: 383-391.
- van Roessel, P. e Brand, A. H. (2004). Spreading silence with Sid. *Genome Biology*, 5: 208.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. e Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3: research0034-research0034.11.
- Verleyen, P., Baggerman, G., D'Hertog, W., Vierstraete, E., Husson, S. J. e Schoofs, L. (2006). Identification of new immune induced molecules in the haemolymph of *Drosophila melanogaster* by 2D-nanoLC MS/MS. *Journal of Insect Physiology*, 52: 379-388.
- Vieira, F. G. e Rozas, J. (2011). Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the Arthropoda: origin and evolutionary history of the chemosensory system. *Genome biology and evolution*, 3: 476-490.
- Vieira, F., Sanchez-Gracia, A. e Rozas, J. (2007). Comparative genomic analysis of the odorant-binding protein family in 12 *Drosophila* genomes: purifying selection and birth-and-death evolution. *Genome Biology*, 8: R235.
- Vogt, R. G. e Riddiford, L. M. (1981). Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293: 161-163.
- Vosshall, L. B., Amrein, H., Morozov, P. S., Rzhetsky, A. e Axel, R. (1999). A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 96: 725-736.
- Vreysen, M. J. B., Saleh, K. M., Ali, M. Y., Abdulla, A. M., Zhu, Z. R., Juma, K. G., Dyck, V. A., Msangi, A. R., Mkonyi, P. A. et al. (2000). *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the Sterile Insect Technique. *Journal of Economic Entomology*, 93: 123-135.
- Walshe, D. P., Lehane, S. M., Lehane, M. J. e Haines, L. R. (2009). Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. *Insect Molecular Biology*, 18: 11-19.
- Wang, J., Hu, C., Wu, Y., Stuart, A., Amemiya, C., Berriman, M., Toyoda, A., Hattori, M. e Aksoy, S. (2008). Characterization of the antimicrobial peptide attacin loci from *Glossina morsitans*. *Insect Molecular Biology*, 17: 293-302.
- Wang, Y., Tang, N., Hui, T., Wang, S., Zeng, X., Li, H. e Ma, J. (2013). Identification of endogenous reference genes for RT-qPCR analysis of plasma microRNAs levels in rats with acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Journal of Applied Toxicology*, 33: 1330-1336.
- Waterhouse, P. M., Wang, M. B. e Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, 411: 834-842.
- White, I. M. e M. M. Elson-Harris. (1992). *Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics*. Wallingford: CAB International
- Winston, W. M., Molodowitch, C. e Hunter, C. P. (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein *SID-1*. *Science*, 295: 2456-2459.
- Wolfner, M. F. (1997). Tokens of love: Functions and regulation of drosophila male accessory gland products. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27: 179-192.
- Yi, H. Y., Chowdhury, M., Huang, Y. D. e Yu, X. Q. (2014a). Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98: 5807-5822.
- Yi, X., Zhao, H., Wang, P., Hu, M. e Zhong, G. (2014b). Bdor/Orco is important for oviposition-detering behavior induced by both the volatile and non-volatile repellents in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Physiology*, 65: 51-56.

- Yuval, B., Ben Ami, E., Behar, A., Ben Yosef, M. e Jurkevitch, E. (2013). The Mediterranean fruit fly and its bacteria – potential for improving sterile insect technique operations. *Journal of Applied Entomology*, 137: 39-42.
- Zheng, W., Peng, W., Zhu, C., Zhang, Q., Saccone, G. e Zhang, H. (2013). Identification and expression profile analysis of Odorant Binding Proteins in the Oriental Fruit Fly *Bactrocera dorsalis*. *International Journal of Molecular Science*, 14: 14936-14949.
- Zucchi, R.A. (2000). Taxonomia. in Malavasi, A. e Zucchi, R. A. (eds.) *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Ribeirão Preto: Holos Editora.
- Zucchi, Roberto A. Fruit flies in Brazil - Anastrepha species their host plants and parasitoids. <http://www.lea.esalq.usp.br/anastrepha/> . 2008. 2014.
- Ref Type: Electronic Citation
- Zuk, M. e Stoher, A. M. (2002). Immune defense and host life history. *The American Naturalist*, 160: S9-S22.

ANEXOS





Anexo 1. Curva padrão e curva de desnaturação (*melting*) para os oito genes candidatos a genes de referência para estudos de expressão por qPCR em *A. obliqua*. Eficiência da reação (E) e correlação (R²) são mostrados no gráfico de curva padrão para cada par de *primer* testado (gráficos apresentados à esquerda). As análises de curva de desnaturação gerado para todas as reações mostram único pico indicando a especificidade da reação (gráficos apresentados à direita). *rpl18* – ribosomal protein L18; *btub* – β -Tubulin; *ef1a* – elongation factor 1 α ; *rps17* – ribosomal protein S17; *gapdh* – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Syx* – syntaxin; *TpnC* – troponin C and *act* – actin.

Gene	Amostra	Média Cq	Cq DP
act	LII	17,88	0,58452
act	LIII	19,02	0,64433
act	FMV	20,36	0,25127
act	MVM	22,11	0,25476
act	FPC	20,88	0,34447
act	MPC	22,16	0,26548
act	PI	23,78	0,59249
act	PII	24,67	0,23661
btub	LII	19,32	0,12506
btub	LIII	19,51	0,24735
btub	FMV	20,2	0,12686
btub	MVM	20,94	0,07955
btub	FPC	19,65	0,06709
btub	MPC	21,03	0,14681
btub	PI	21	0,44461
btub	PII	19,64	0,05837
ef1a	FPC	18,62	0,24321
ef1a	FVM	19,21	0,25271
ef1a	LII	18,32	0,44164
ef1a	LIII	18,41	0,25221
ef1a	MPC	19,79	0,17762
ef1a	MVM	19,72	0,26640
ef1a	PI	19,44	0,25770
ef1a	PII	20,31	0,19348
gapdh	LII	19,72	0,25350
gapdh	LIII	20,65	0,19294
gapdh	FMV	19,71	0,35860
gapdh	MVM	20,01	0,44714
gapdh	FPC	20,26	0,26537
gapdh	MPC	20,45	0,32784
gapdh	PI	22,65	0,75118
gapdh	PII	22,47	0,38946
rpl18	FPC	20,84	0,33793
rpl18	FVM	21,28	0,35168
rpl18	LII	20,12	0,32144
rpl18	LIII	21,24	0,29845
rpl18	MPC	21,84	0,39662
rpl18	MVM	21,69	0,40495
rpl18	PI	22,04	0,46274
rpl18	PII	22,26	0,43960
rps17	FPC	20,48	0,30487
rps17	FVM	21	0,33073
rps17	LII	20,07	0,23339

rps17	LIII	20,93	0,36266
rps17	MPC	21,26	0,29325
rps17	MVM	21,33	0,36250
rps17	PI	22,55	0,93468
rps17	PII	21,75	0,40097
Syx	LII	26,97	0,26064
Syx	LIII	26,13	0,52003
Syx	FMV	25,81	0,45306
Syx	MVM	26,01	0,55126
Syx	FPC	25,37	0,51444
Syx	MPC	25,91	0,38072
Syx	PI	26,31	0,79694
Syx	PII	27,12	0,50066
TpnC	LII	24,4	0,21044
TpnC	LIII	25,84	0,19827
TpnC	FMV	24,29	0,52021
TpnC	MVM	25,66	0,67622
TpnC	FPC	26,22	0,57908
TpnC	MPC	25,74	0,47354
TpnC	PI	28,27	0,85962
TpnC	PII	24,91	0,47733

Anexo 2. Valores de quantificação da expressão relativa para os oito genes candidatos a genes de referência para estudos de expressão por qPCR em *A. obliqua*. *rpl18* – ribosomal protein L18; *btub* – β -Tubulin; *ef1a* – elongation factor 1 α ; *rps17* – ribosomal protein S17; *gapdh* – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Syx* – syntaxin; *TpnC* – troponin C and *act* – actin. LII – larvas de segundo instar; LIII – larvas de terceiro instar; PI – pupas de primeiro estágio; PII – pupas de segundo estágio; FVM – fêmeas virgens sexualmente maduras; MVM – machos virgens sexualmente maduros; FPC – fêmeas 24 horas pós-cópula; MPC – machos 24 horas pós-cópula.


```

      . . . . | . . . .
      W   G   *
C. cap tggggctaa
      W   G   *
Consenso tggggttaa
      W   G   *
A. fra tggggctaa

```

Anexo 3. Fragmento referente à CDS do gene similar a *AttA* em *D. melanogaster*. C. cap – sequência de mRNA de *C. capitata* do gene *sarcotoxin II-3-like* (XP_004520308.1), que é similar à *AttA* de *D. melanogaster*. A. fra – fragmento de 900 pb retirado do transcriptoma de *A. fraterculus* referente ao *malerep1_ctg26002* que apresentou 78% de identidade com a sequência C. cap. Consenso – sequência consenso gerada pelo CAP3 com todos os transcritos oriundos do BLAST feito com a sequência A. fra nos transcriptomas de cabeça e tecido reprodutivo de *A. obliqua* e *A. fraterculus*. Os *primers* desenhados para as ampliações por PCR e obtenção do sequenciamento pelo método Sanger estão indicados em azul. Para este gene não conseguimos obter o sequenciamento pelo método Sanger. Os *primers* desenhados para as ampliações por qPCR utilizado nos estudos de expressão estão indicados em amarelo. Os *primers* desenhados para síntese do dsRNAAttA estão indicados em verde e a eles foi adicionada uma cauda T7 taatacgaactcactatagggcga na extremidade 5’.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130     140     150
C. cap M H F K P D K L I R R F D R H C K Y H I N T S A W S K E N Q N E T S V R I K M K F L I V F A F A L V
A. fra -----atgaaagctttcattgtattcgttttgga-----atc
      160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
C. cap A S A S A A N L D A I S Q P A F A S G R I I N G Y E A Q K G E A P F I V S L K T S S H F C A G S I I
A. fra gccacgtgagtgccgccaatctggagcgtgttacaaccgcgttttgcatcaggagcgtatcacaacgggttagggctcaaaagggtgaggcccgtaacatgctttcaactaaagtcgatcttcgacttctgtgctggctccatc
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400     410     420     430     440     450
C. cap D E N W V L T A A H C L V Y N S F Q V V A G L H S R N D E S D V Q I R K V T S K S Q Y I V H E E Y G
A. fra gatgaaaactgggtacttaccgctgtttggctctataaacagcttccaagttgtggctgtcgaactcgcgaacgatgaattctgatgtcagatcgcgaagtgaccagcaagtcgcagtcacatgcgatgaggaatattggc
      460     470     480     490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
C. cap G G V G P N D I G L I Y I P D G F D L T A L A R D G S A P V D K V S L P S G K Y E S T G D G K L F G
A. fra aaatgagaattgggtactcactgctgccactgtttgatctacgacagcttcagcgttagctcgtgtcgaactccgcgaacgacgaatcgaaatgccaatcagtaaggtcaccagcaaatcccagtcagtcgatcaggacatgggt
      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720     730     740     750
C. cap W G R D N S G A L P N V L Q T L D A Q I I G Y S E C K A A L P L L A P I K D V N I C S Y T A G T T D
A. fra tggggagctgacaattccggctctttgcccaatgtgctacaaaacttggatgccaaaattctggctacagtgaaatgcaaggctgctttggcccttttggcaccatcaaggatgtgaaatcttgctacacactgctggcaccaccgac
      760     770     780     790     800     810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
C. cap W G R D N S G A L P N V L Q T L D A Q I I G Y S E C K A A L P L F A P I K D V N I C S Y N A G T T D
A. fra tggggagctgacaattccggctgctttgcccaatgtgctacaaaacttggatgccaaaattactcggcttaactccgagtgcaaaagctgctctaccctcttccgcgccatcaaggatgtaaacatgatgctacatacaatgctggtagcaccgat
      910     920
C. cap I K E Q I N A *
A. fra atcaaggagcagatcaatgcctga
      I T E K I R N *
A. fra atcaccggagaagatccgtaactgaat

```

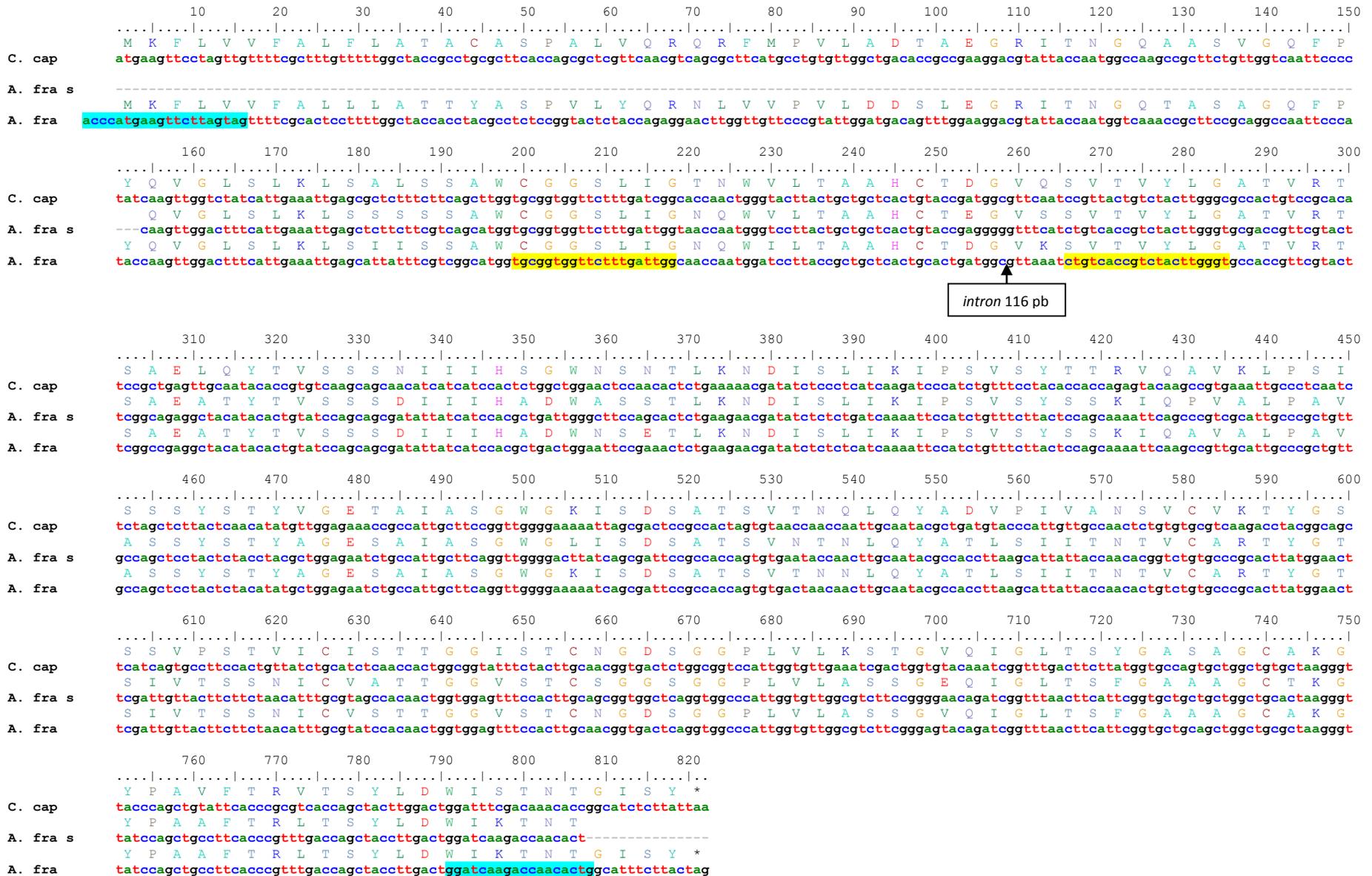
Anexo 4. Fragmento referente à CDS do gene similar a *CG11912* em *D. melanogaster*. C. cap – sequência de mRNA de *C. capitata* do gene *lectizyme-like* (XM_004536191.1), que é similar à *CG11912* de *D. melanogaster*. A. fra – fragmento de 804 pb retirado do transcriptoma de *A. fraterculus* referente ao *contig malerep1_ctg_18543* que apresentou 86% de identidade com a sequência C. cap. Os *primers* desenhados para as ampliações por PCR e obtenção do sequenciamento pelo método Sanger estão indicados em azul. Para este gene não conseguimos obter o sequenciamento pelo método Sanger. Os *primers* desenhados para as ampliações por qPCR utilizado nos estudos de expressão estão assinalados em amarelo.


```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
D. mel M L K F V I L L S A V A C A L G G T V P E G L L P Q L D G R I V G G S A T T I S
A. fra atgctgaagttctgtgatctgtttgtctgtcagtagcctgcgcctgggagggcaccgtccctgagggactcctgcctcagttggatggccgcatgttgggggctctgtaccaccatcagc
      130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
D. mel S F P W Q I S L Q R S G S H S C G G S I Y S S N V I V T A A H C L Q S V S A S V
A. fra agcttcccctggcagatctcccgcagcgcagtggaagccactcctgcggtggatccatctactccagcaacgctcactgtgaccgcccctcactgtctgagtcocgttccgcttcogtcc
      250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
D. mel ctgcagatccctgtcggatcccagctactggagctccggcgggtgcaacctctctgtgtcctccttcaagaaccaegggctacaacgccaacccaatggcacaegcattgccatc
A. fra tccttcccattggcaaatatccttgcagcgttcgggctctcattcttgcggtggatcgatcttacagcttaacatcattgtaaccgctgctcactgtttgcaatcgggtaccgcttctgtg
      370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
D. mel L Q I R A G S S Y W S S G G V T F S V S S F K N H E G Y N A N T M V N D I A I I
A. fra ctggaaggcccgctggttccacaacctggaaactccggcgggtgattgatacaggctctccgcattcaagaaatcagcaatcttactcctccagcgcctataccaacgatattgccgttacc
      490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
D. mel K I N G A L T F S S T I K A I G L A S S N P A N G A A A S V S G W G T L S Y G S
A. fra aagatcaaacggcgccctgaccttcagctccaccatcaaggccatcggctctggctagctcaaaccccgcaaacggcgtctggccctccgtctccggatggggcaactctctccacggatcc
      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
D. mel R L A S S L S F S S S I K A I S L A S S A P A N G A A A A V S G W G T L T S G A
A. fra cgcttggcttcttcgctttctcagttccatccatcaaaagcaatgagtttggtagctcagcaccctgcacaatggcgcgctgctgctgtgctccggctggggtaactcotaacatccgggtg
      730     740     750     760     770
D. mel S S I P S Q L Q Y V N V N I V S Q S Q C A S S T Y G Y G S Q I R S T M I C A A A
A. fra agctccatcccctcccagctgagtgacgtgaacgtgaaacatcgttagccagagccagtggtgcttccctccactacggatagcggatgccagatcccgagcaccatgatctgcgctgctgcc
      730     740     750     760     770
D. mel S S I P S T L Q Y V N V N I V S L S R C A S S S Y G Y G S Q V K G A M I C A A A
A. fra togtaattcccagacacattgagtagtcaaatgtaattgtcagtttgctaggtgagcttccagttcttatgggtacggtagccaaagcaaaaggcccatgatctgtgctgctgccc
      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
D. mel S G K D A C Q G D S G G P L V S G G V L V G V V S W G Y G C A Y S N Y P G V Y A
A. fra agcggcaaggatgcctgccagggtagctccgggtggcccactggctccggcggagtcctcgtcgggtttgtctcctggggatagggatgagcttactccaactaccgggtgtctatgcc
      730     740     750     760     770
D. mel S G K D A C Q G D S G G P L V S G G V L V G V V S W G Y G C A Y A N Y P G V Y A
A. fra tccggcaaaagacgcttgcagggtagttctggtggcccattggatctggtggagtggtggtggtggttatcctggggttacgggtgtgcatcagccaactatccagggtgtgtagct
      730     740     750     760     770
D. mel gatgttgctgccctccgctcctgggtgatcaacaagcctaa
A. fra gacgtggctgctcagttcgtgggtgggtgcgacccgctagctcagtttaa
      730     740     750     760     770
D. mel D V A A L R S W V I N N A *
A. fra D V A A L R S W V V R T A S S V *

```

Anexo 6. Fragmento referente à CDS do gene similar a *CG30025* em *D. melanogaster*. D. mel – sequência de mRNA de *D. melanogaster* do gene *CG30025* (NM_165825.2). A. fra – fragmento de 768 pb retirado do transcriptoma de *A. fraterculus* referente ao *contig malerep1_ctg16922* que apresentou 80% de identidade com a sequência D. mel. Os *primers* desenhados para as ampliações por PCR e obtenção do sequenciamento pelo método Sanger estão indicados em azul. Para este gene não conseguimos obter o sequenciamento pelo método Sanger. Os *primers* desenhados para as ampliações por qPCR utilizado nos estudos de expressão estão assinalados em amarelo.



Anexo 7. Fragmento referente à CDS do gene similar a *Jon65Aiv* em *D. melanogaster*. C. cap – sequência de mRNA de *C. capitata* (XM_004524398.1) referente ao gene *serine protease 1/2-like*, que é similar à *Jon65Aiv* de *D. melanogaster*. A. fra s – sequência obtida pelo sequenciamento via Sanger. A. fra – fragmento de 819 pb retirado do transcriptoma de *A. fraterculus* referente ao *contig male_rep1_ctg_27212* que apresentou 78% de identidade

com a sequência C. cap. Os *primers* desenhados para as ampliações por PCR e obtenção do sequenciamento pelo método Sanger estão indicados em azul. O sequenciamento revelou uma região de *intron* de 116 pb indicado com seta. Os *primers* desenhados para as ampliações por qPCR utilizado nos estudos de expressão estão assinalados em amarelo.

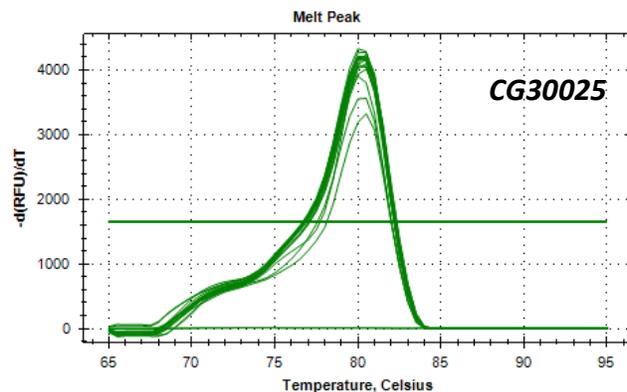
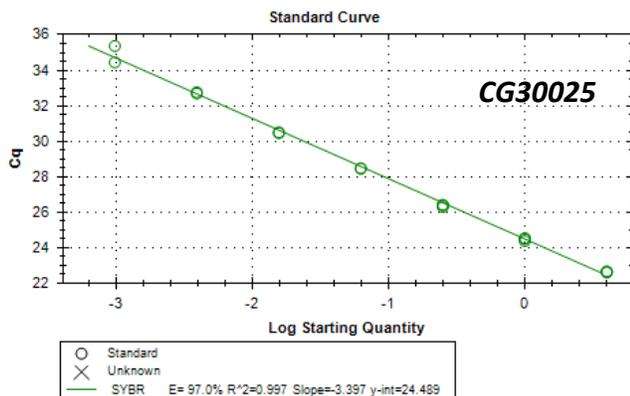
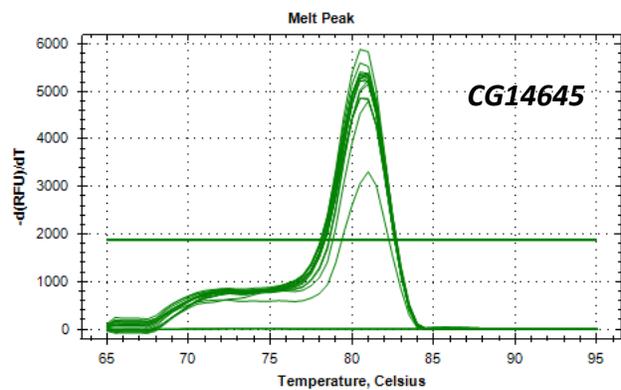
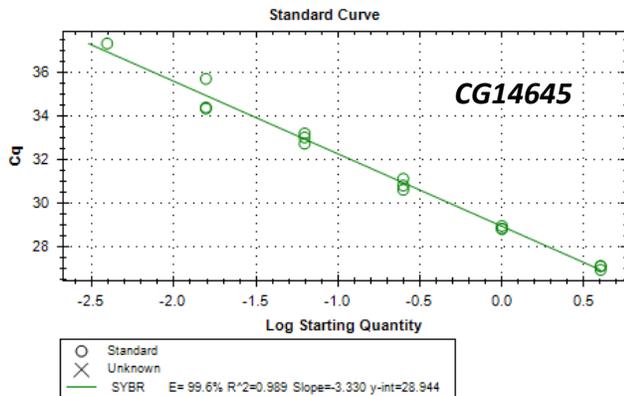
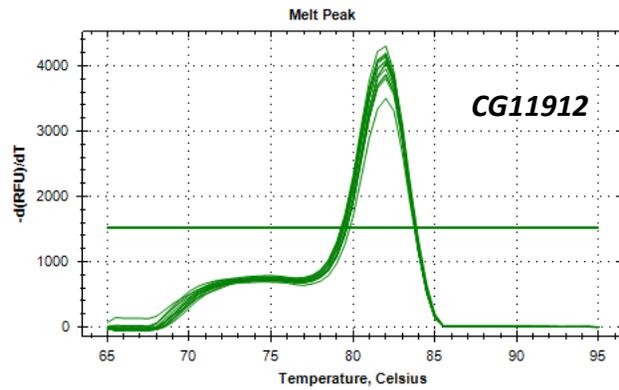
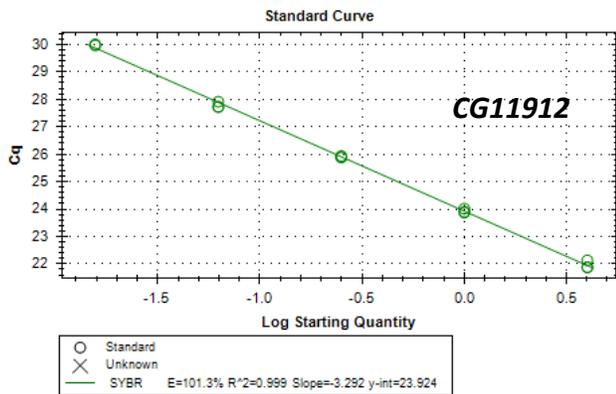
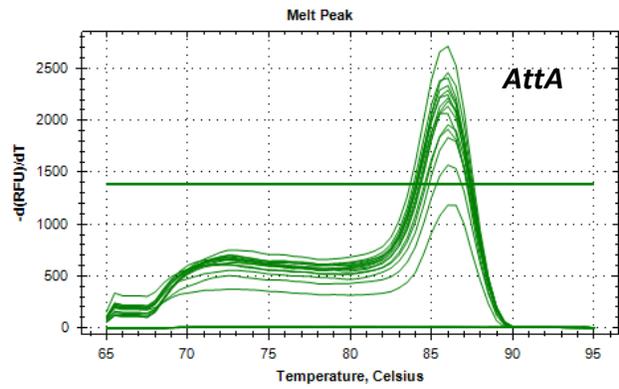
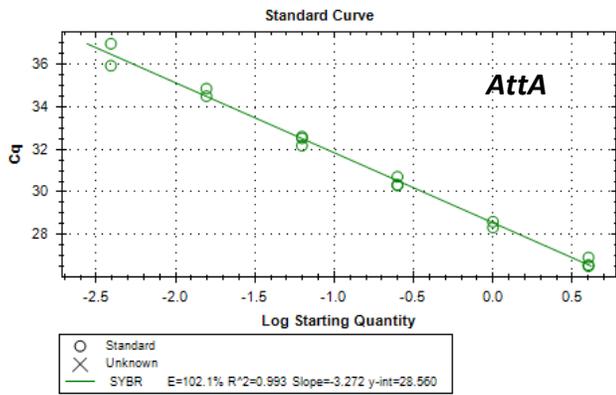
Anexo 10. Fragmento referente à CDS do gene similar a *Obp99c* em *D. melanogaster*. C. cap – sequência de mRNA de *C. capitata* (XM_004521129.1) referente ao gene *odorant-binding protein 99a-like*, que é similar à *Obp99c* de *D. melanogaster*. A. fra – fragmento de 411 pb retirado do transcriptoma de *A. fraterculus* referente ao *CabecaMachoCompleta-contig_12788* que apresentou 33% de identidade com a sequência C. cap. Consenso 1 e consenso 2 – 2 sequências consenso geradas pelo CAP3 com alguns transcritos oriundos do BLAST feito com a sequência A. fra nos transcriptomas de cabeça e tecido reprodutivo de *A. obliqua* e *A. fraterculus*. Os *primers* desenhados para as ampliações por PCR e obtenção do sequenciamento pelo método Sanger estão indicados em azul. O sequenciamento revelou uma região de *intron* de 108 pb indicado com seta. Os *primers* desenhados para as ampliações por qPCR utilizado nos estudos de expressão estão assinalados em amarelo. Os *primers* desenhados para síntese do dsRNA*Obp99c* estão assinalados em verde e a eles foi adicionada uma cauda T7 taatacgaactcactatagggcga na extremidade 5’.

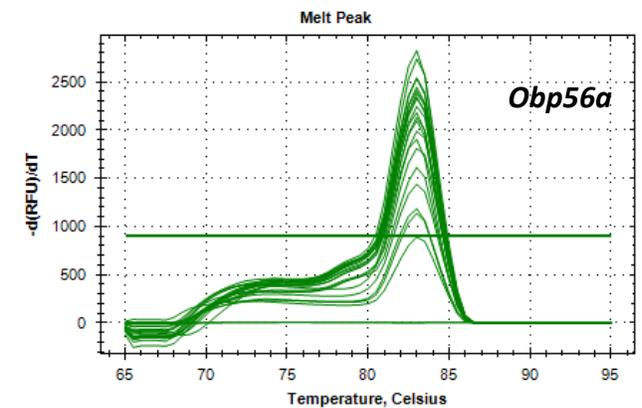
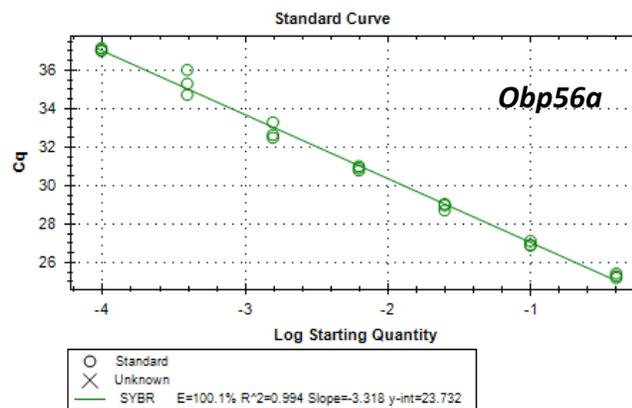
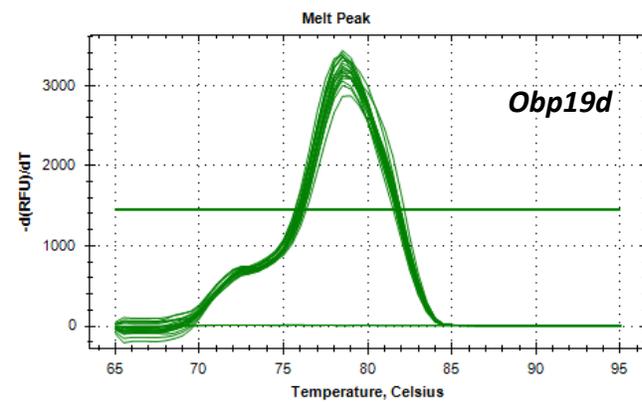
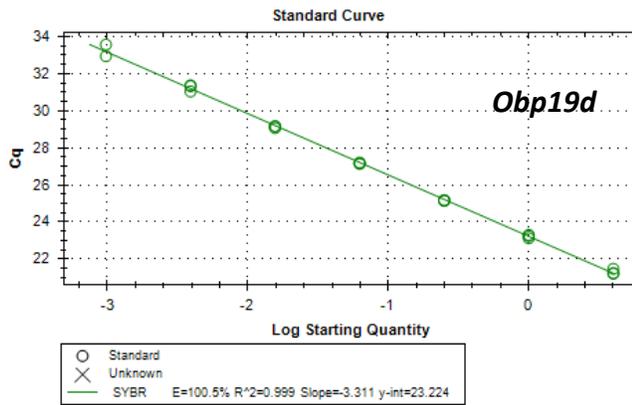
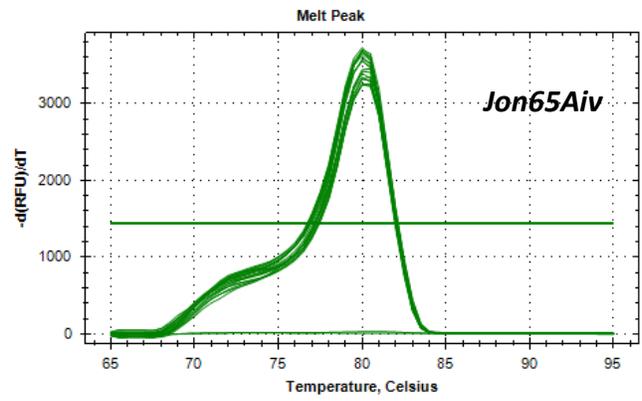
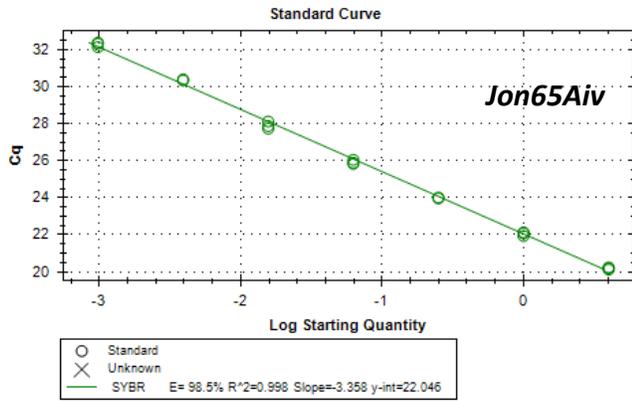
```

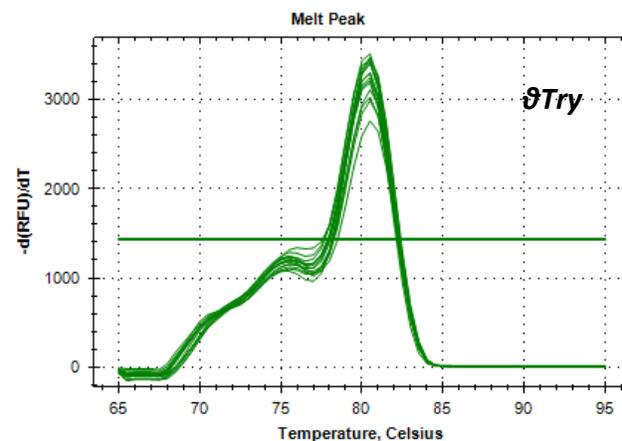
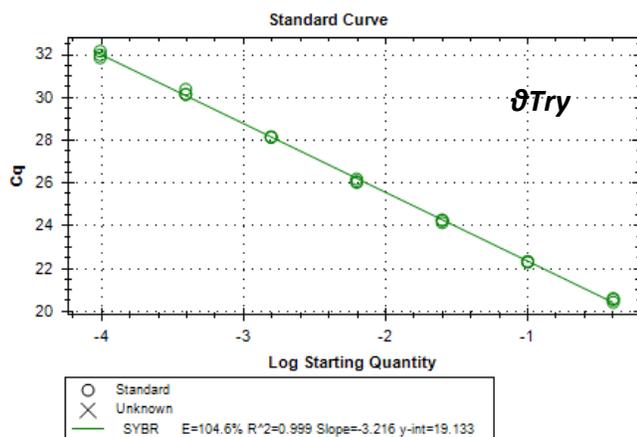
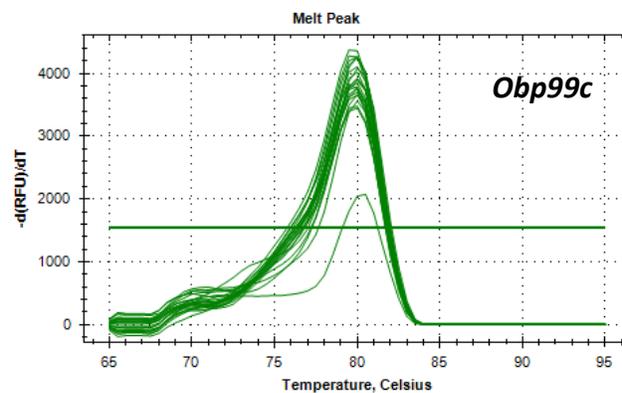
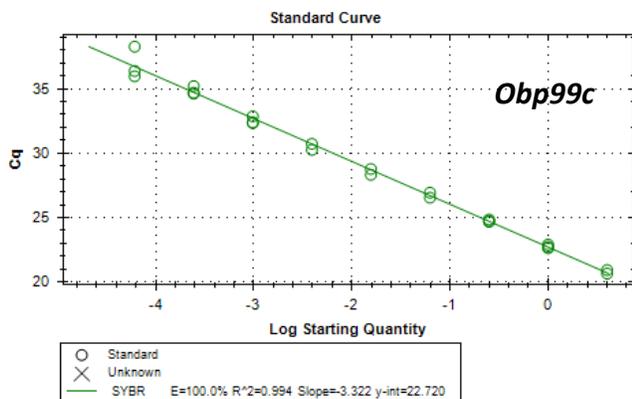
      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
C. cap M F R F V A L F A V V S L A Y G A T L P D D L D G R I V N G V D T T I S E H P Y
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A. fra atgtttcgtttttgtagccttcttcgttggctagccttggcctatggcgccacccctgccgatgtttggatggagcgtattgtgaatgggtgggacaccaatttagcgagcatccctat
      130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
C. cap Q V S I Q T L S G G H F C G G S I I N E D T I V T A A H C L Q S Y T A K Q M Q V
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A. fra cagggtatccatacaaaactttgagtggtgggacacttctcgggtggcagttattatcaatgaggacaccattgtaacggctgcacattgcttgcattogtatactgctaaaacagatgcaagtg
      250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
C. cap R L G S T N Y K L G G E L V A V R A F A F H P G Y N S K T M V N D V G L L K L A
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A. fra cgttttgggtcacaacattacaacacttggcggtagaacttggcttctgtagcgtgcatttgctttccaccaggctacaatagcaagaacaatggtagaacgtagtgggtttgttgaattggcc
      370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
C. cap T P V A E S A N I R Y I K L A Q S T P A T G T P A A V T G W G T K C Y L T C L T
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A. fra acacocagtagcggagctcgcgaatatacgtttacaattaaagttggcacaagcacaccggccaccggtagcaccagctgctgttaccgggtgggggtactaaatgttatctgacctgctgact
      490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
C. cap S P V A E S A N I K Y I K L A E K T P E T G T L A V V T G W G T K C Y L T C I S
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A. fra tctccagtggcagagctccgccaattataaatacatcaaaattggcggaaaagacaccagaaaactggcactttggctgtagtcacccgggtgggggtactaaatgctacccttacttgcatatct
      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
C. cap L P T T L Q L V E V D I V D V A D C A S S T Y K Y G S E V K D T M V C A Y A V S
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A. fra ttgccaactactcccaagaggctgaagtagatattgttagtagaggcggcttgcctcttagcaogtacaagtagtggcttccaaatccaggaaaacaatggtttgctgctatgctgagtg
      730     740     750     760
      |.....|.....|.....|.....|
C. cap K D A C Q G D S G G P L V A E N Q L V G V V S W G R G C A R E G Y P G V Y S D V
      |.....|.....|.....|.....|
A. fra aaaggatgcctgtcaagtgattctgggtggccattagtggtgagaaaccaattgggtgggtgttgcctggggtagaggttgcctagagagggttaccocaggcgtgactctgactgtg
      730     740     750     760
      |.....|.....|.....|.....|
C. cap A S L Y S W I V D A E A T L *
      |.....|.....|.....|.....|
A. fra K D A C Q G D S G G P L V A N S Q L V G V V S W G Y G C A R T G Y P G V Y S D V
      |.....|.....|.....|.....|
A. fra ccttcaactacgctcgtgggtcgagactaccatggctagcatgtctttaa

```

Anexo 11. Fragmento referente à CDS do gene similar a θTry em *D. melanogaster*. C. cap – sequência de mRNA de *C. capitata* do gene *trypsin-like* (XM_004517718.1), que é similar à θTry de *D. melanogaster*. A. fra – fragmento de 768 pb retirado do transcriptoma de *A. fraterculus* referente ao *contig malerep1_ctg_16782* que apresentou 76% de identidade com a sequência C. cap. Os *primers* desenhados para as ampliações por PCR e obtenção do sequenciamento pelo método Sanger estão indicados em azul. Para este gene não conseguimos obter o sequenciamento pelo método Sanger. Os *primers* desenhados para as ampliações por qPCR utilizado nos estudos de expressão estão assinalados em amarelo.







Anexo 12. Curva padrão e curva de desnaturação (*melting*) para os nove genes candidatos em *A. obliqua*. Eficiência da reação (E) e correlação (R²) são mostrados no gráfico de curva padrão para cada par de *primer* testado (gráficos apresentados à esquerda). As análises de curva de desnaturação gerado para todas as reações mostram único pico indicando a especificidade da reação (gráficos apresentados à direita). *AttA* – *Attacin-A*, *CG11912*, *CG14645*, *CG30025*, *Obp19d* – *Odorant-binding protein 19d*, *Obp56a* – *Odorant-binding protein 56a*, *Obp99c* – *Odorant-binding protein 99c*, *thetaTry* – *thetaTrypsin*.

Gene	Amostra	Expressão relativa normalizada	Média Cq	Cq DP
AttA	LII	0,04785	26,66	0,5227
AttA	LIII	0,00845	29,96	0,3597
AttA	FVM	0,20510	25,66	0,0664
AttA	MVM	2,86943	22,28	1,1078
AttA	FPC	0,16122	25,49	0,4559
AttA	MPC	1,50705	23,25	0,3396
AttA	PI	0,45344	25,37	0,3267
AttA	PII	0,23707	26,40	0,3108
CG11912	LII	0,00079	31,19	0,6746
CG11912	LIII	0,00151	31,04	0,2735
CG11912	FVM	2,13269	20,88	0,6500
CG11912	MVM	1,75395	21,59	0,4652
CG11912	FPC	1,43366	20,94	0,4275
CG11912	MPC	1,31456	22,05	0,4506
CG11912	PI	0,00207	31,74	0,8668
CG11912	PII	0,00423	30,81	0,8578
CG14645	LII	0,01352	30,33	0,6434
CG14645	LIII	0,02614	30,18	0,6506
CG14645	FVM	1,21074	24,94	1,0355
CG14645	MVM	2,45828	24,35	0,9895
CG14645	FPC	1,36945	24,25	1,0704
CG14645	MPC	2,95933	24,12	0,7005
CG14645	PI	0,00156	35,40	0,5020
CG14645	PII	0,00541	33,70	1,6449
CG30025	LII	1,00000	19,99	0,6610
CG30025	LIII	1,49615	20,21	0,3323
CG30025	FVM	1,62068	20,39	0,4018
CG30025	MVM	1,71251	20,74	0,3670
CG30025	FPC	1,07788	20,47	0,3276
CG30025	MPC	1,31045	21,17	0,4015
CG30025	PI	0,00260	30,53	0,2383
CG30025	PII	0,00253	30,66	0,4245
Jon65AIV	LII	0,69280	17,73	0,4744
Jon65AIV	LIII	1,73341	17,20	0,5077
Jon65AIV	FVM	0,42529	19,53	0,5333
Jon65AIV	MVM	0,38513	20,10	0,3476
Jon65AIV	FPC	0,28301	19,60	0,3090
Jon65AIV	MPC	0,27135	20,65	0,3746
Jon65AIV	PI	0,00050	30,10	0,4538

Jon65AIV	PII	0,00038	30,61	0,8275
Obp19d	LII	0,00004	34,71	0,8991
Obp19d	LIII	0,06523	24,82	0,7531
Obp19d	FVM	1,75134	20,37	0,4797
Obp19d	MVM	2,68906	20,18	0,4866
Obp19d	FPC	0,88891	20,84	0,4771
Obp19d	MPC	2,95933	20,09	0,3758
Obp19d	PI	0,04932	26,38	0,2937
Obp19d	PII	0,00073	32,55	0,5824
Obp56a	LII	0,00073	34,13	0,6807
Obp56a	LIII	0,00150	33,87	0,9846
Obp56a	FVM	2,13269	23,70	1,0419
Obp56a	MVM	0,66099	25,81	1,1942
Obp56a	FPC	0,19355	26,65	0,3640
Obp56a	MPC	0,58734	26,03	0,4612
Obp56a	PI	0,00527	33,21	0,9670
Obp56a	PII	0,00402	33,70	0,1891
Obp99c	LII	0,00002	33,05	0,2677
Obp99c	LIII	0,00004	32,85	0,5984
Obp99c	FVM	0,04319	23,18	0,2347
Obp99c	MVM	2,26190	17,90	0,5307
Obp99c	FPC	0,02525	23,45	0,3531
Obp99c	MPC	2,95933	17,56	0,4414
Obp99c	PI	0,00010	32,78	0,7795
Obp99c	PII	0,00289	28,04	0,4402
ØTry	LII	1,00000	15,86	0,7685
ØTry	LIII	0,81501	16,95	0,9244
ØTry	FVM	0,12084	20,01	0,4869
ØTry	MVM	0,14858	20,14	0,3476
ØTry	FPC	0,07701	20,14	0,2765
ØTry	MPC	0,15394	20,13	0,4504
ØTry	PI	0,00009	31,25	0,0947
ØTry	PII	0,00066	28,48	0,4638

Anexo 13. Valores de quantificação da expressão relativa para os oito genes candidatos a genes de referência para estudos de expressão por qPCR em *A. obliqua*. *rpl18* – ribosomal protein L18; *btub* – β -Tubulin; *ef1a* – elongation factor 1 α ; *rps17* – ribosomal protein S17; *gapdh* – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Syx* – syntaxin; *TpnC* – troponin C and *act* – actin. LII – larvas de segundo instar; LIII – larvas de terceiro instar; PI – pupas de primeiro estágio; PII – pupas de segundo estágio; FVM – fêmeas virgens sexualmente maduras; MVM – machos virgens sexualmente maduros; FPC – fêmeas 24 horas pós-cópula; MPC – machos 24 horas pós-cópula.