



DÉBORAH HELOÍSA BITTENCOURT MACHADO

***Bacillus thuringiensis* E RNA INTERFERENTE COMO
FERRAMENTAS DE CONTROLE DA FORMIGA
CORTADEIRAS *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)**

**LAVRAS-MG
2020**

DÉBORAH HELOÍSA BITTENCOURT MACHADO

***Bacillus thuringiensis* E RNA INTERFERENTE COMO FERRAMENTAS DE
CONTROLE DA FORMIGA CORTADEIRA *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia Vegetal para
obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

Dr. Wesley Pires Flausino Máximo
Coorientador

**LAVRAS-MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Machado, Déborah Heloísa Bittencourt.
Bacillus thuringiensis e RNA interferente como ferramentas de
controle da formiga cortadeira *Atta sexdens*
(Hymenoptera:Formicidae) / Déborah Heloísa Bittencourt
Machado. - 2020.
80 p. : il.

Orientador(a): Luciano Vilela Paiva.
Coorientador(a): Wesley Pires Flausino Máximo.
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.
Bibliografia.

1. Formigas cortadeiras. 2. Maquinaria do RNAi. 3. Bactéria
entomopatogênica. I. Paiva, Luciano Vilela. II. Máximo, Wesley
Pires Flausino. III. Título.

DÉBORAH HELOÍSA BITTENCOURT MACHADO

***Bacillus thuringiensis* E RNA INTERFERENTE COMO FERRAMENTAS DE
CONTROLE DA FORMIGA CORTADEIRA *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)**

***Bacillus thuringiensis* AND INTERFERENT RNA AS CUTTING ANT CONTROL
TOOLS *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 03 de fevereiro de 2020.

Dr. Fernando Hercos Valicente	UFLA
Dr. Ronald Zanetti Bonetti Filho	UFLA
Dr. Newton Portilho Carneiro	EMBRAPA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

Dr. Wesley Pires Flausino Máximo
Coorientador

**Lavras
2020**

*À minha mãe Aparecida, por ser
meu exemplo de amor, força e amizade.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho, me dar forças para seguir sempre em frente e me mostrar a luz em meio a escuridão.

Aos meus pais Aparecida e Haires, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. E graças à união de todos, os obstáculos foram ultrapassados, vitórias foram conquistadas e alegrias divididas. Agradeço pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa jornada. Muitíssimo obrigado.

Ao meu irmão Daniel, pela amizade, carinho e companheirismo de sempre, por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas. Pelo apoio e incentivo. Obrigado!

Aos professores Fernando e Newton, meus primeiros orientadores. Obrigado por despertarem em mim o amor pela pesquisa.

Ao Luciano, pela orientação, incentivo, paciência e confiança para realização de um projeto tão importante. Meu muito obrigado por aguentar minha choradeira no final do mestrado e por me dar conselhos e ensinamentos tão valiosos que levarei para vida.

Ao Wesley por todo apoio, incentivo e puxões de orelha que foram de grande importância pessoal e profissional. Obrigado por ouvir minhas reclamações, aconselhar e me passar conhecimentos importantíssimos nesta jornada. Que além de Co-orientador se tornou um amigo.

Agradeço a Kalynka por toda ajuda e ensinamentos na elaboração de artigos e condução de experimentos.

Ao professor Ronald e a Léia, pelos ensinamentos valiosos e auxílio na condução dos experimentos.

À Ana Paula, Gabi, Patrícia, Aline e Amanda por se tornarem minha família em Lavras, pelos momentos de descontração e apoio emocional. Este laço de amizade pretendo levar por toda vida!

Aos amigos Thalita e Djavan que mesmo distantes fizeram meus dias melhores.

Obrigado a todos os amigos do LCBM, pelo apoio, risadas e pela companhia diária. Obrigado por ouvirem meu repertório variado de músicas, eu sei que não é fácil me ouvir cantar pagode diariamente. Agradeço em especial a Tati e Fernanda pelos cafés e conselhos nesses dois anos de mestrado.

Agradeço a Rossilvânia que se tornou uma amiga e conselheira. Por me aguentar diariamente em sua salinha rindo, chorando e contando casos.

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

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

Minha eterna gratidão a todos que direta ou indiretamente contribuíram com o desenvolvimento desta pesquisa e meu crescimento profissional.

Muito obrigada!

*“O fardo é proporcional às forças,
como a recompensa será proporcional à resignação e à coragem”.*
(Allan Kardec)

RESUMO GERAL

O setor da silvicultura enfrenta grandes perdas econômicas e de produtividade devido ao ataque de formigas cortadeiras do gênero *Atta*. Estas formigas causam danos diretos ou indiretos, cortando grande quantidade de material vegetal para a manutenção da colônia e para alimentar seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*. Atualmente, o controle químico é o mais utilizado dentre os disponíveis para as formigas cortadeiras, entretanto, os formicidas mais eficientes pertencem à classe dos POPs (poluentes orgânicos persistentes) que podem causar riscos para o meio ambiente e para a saúde humana. A busca por métodos alternativos ao controle químico encontra-se sob intensa pesquisa, e estas alternativas devem ser menos agressivas ao meio ambiente e também devem atender os padrões de eficiência para o controle de formigas cortadeiras. O objetivo deste trabalho foi utilizar o mecanismo de RNA interferente e a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt) para o controle de formigas cortadeiras *Atta sexdens*. Bioensaios realizados com oito cepas de *B. thuringiensis* demonstraram que cinco induziram mortalidade entre 45% e 59% nas formigas operárias forrageadoras e, os valores foram confirmados pelo postulado de Koch. As diferentes concentrações de *B. thuringiensis* induziram mortalidades entre 41% e 61%. Nas análises de microscopia eletrônica de varredura foi observada a presença de cristais de até 2,0 µm longitudinalmente e de formatos variados, mas não foi possível verificar nenhuma correlação entre a mortalidade e o formato dos cristais. Moléculas de dsRNA homólogas ao gene da *v-atpase a* foram sintetizadas na bactéria *Escherichia coli* HT115 (DE3) e fornecidas sobre dietas às formigas. Duas colônias produtoras de ds-*v-atpase a* exibiram mortalidade de 69%, com início da mortalidade no 6º dia de avaliação. Acredita-se que as bactérias HT115 (DE3) estão sendo capazes de sintetizar dsRNA homólogo ao gene da *v-atpase a*, e que este gene seja de importância vital à sobrevivência destas formigas. O presente trabalho traz informações relevantes acerca da capacidade tanto do *B. thuringiensis* quanto do RNA interferente de induzirem a mortalidade das formigas em bioensaios *in vitro*, colocando essas duas estratégias como potenciais ferramentas para auxiliar no controle de formigas cortadeiras.

Palavras chave: Formigas cortadeiras. Maquinaria do RNAi. Bactéria entomopatogênica.

ABSTRACT

The forestry sector faces great economic and productivity losses due to the attack of leaf-cutting ants of the *Atta* genus. These ants cause damage or indirectly, cutting large amounts of plant material to maintain the colony and to feed its symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. Currently, chemical control is the most used among those available for leaf-cutting ants, however, the most efficient ant killers belong to the class of POPs (persistent organic pollutants) that can cause risks to the environment and human health. The search for alternative methods to chemical control is under intense research, and these alternatives must be less aggressive to the environment and must also meet the efficiency standards for the control of leaf-cutting ants. The objective of this work was to use the mechanism of interfering RNA and the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) for the control of leaf-cutting ants *Atta sexdens*. Bioassays performed with eight strains of *B. thuringiensis* showed that five induced mortality between 45% to 59% in foraging worker ants and the values were confirmed by Koch's postulate. The different concentrations of *B. thuringiensis* induced mortality between 61% and 41%. Scanning electron microscopy analyzes showed the presence of crystals of up to 2.0 μm longitudinally and of varying shapes, but it was not possible to verify any correlation between mortality and the shape of the crystals. dsRNA molecules homologous to the *v-atpase* gene were synthesized in the bacteria *Escherichia coli* HT115 (DE3) and fed to ants on diets. Two colonies producing ds-*v-atpase* exhibited 69% mortality, with onset of mortality on the 6th day of evaluation. It is believed that the HT115 (DE3) bacteria are being able to synthesize dsRNA homologous to the *v-atpase* gene, and that this gene is of vital importance to the survival of these ants. The present work provides relevant information about the ability of both *B. thuringiensis* and interfering RNA to induce ant mortality in *in vitro* bioassays, placing these two strategies as potential tools to help control leaf-cutting ants.

Key words: Leaf-cutting ants. RNAi machinery. Entomopathogenic bacterium.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Formigas cortadeiras do gênero <i>Atta</i>	16
2.2 Ataque e controle de formigas cortadeiras.	19
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
2.4 RNA interferente	25
2.5 ATPases Vacuolares (<i>VATPases</i>)	27
2.6 Bactérias <i>Escherichia coli</i> linhagem HT115 (DE3) como produtoras de dsRNA	29
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	30
REFERÊNCIAS	30
SEGUNDA PARTE	41
Artigos	41
ARTIGO 1 – <i>Bacillus thuringiensis</i> como ferramenta de controle de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae)	42
RESUMO	43
ABSTRACT	44
1 INTRODUÇÃO	45
2 MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Local dos experimentos	46
2.2 Coleta, criação e manutenção da colônia de <i>Atta sexdens</i>	46
2.3 Isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	46
2.4 Fornecimento de cepas públicas de <i>Bacillus thuringiensis</i> via dieta artificial para forrageadoras de <i>Atta sexdens</i>	47
2.5 Postulado de Koch	48
2.6 Teste de mortalidade com diferentes concentrações de esporos de <i>Bacillus thuringiensis</i>	49
2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	49
2.8 Análises estatísticas	50
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	62
ARTIGO 2 – RNA interferente como ferramenta de controle de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) com dsRNA do gene <i>v-atpase a</i>	67
RESUMO	68

ABSTRACT	69
1 INTRODUÇÃO.....	70
2 MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1 Local dos experimentos.....	72
2.2 Coleta, criação e manutenção da colônia de <i>Atta sexdens</i>	72
2.3 Transformação de bactérias <i>Escherichia coli</i> linhagem HT115 para produção de dsRNA	72
2.4 Bioensaios de mortalidade com formigas forrageadoras.....	73
2.5 Análises estatísticas	74
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4. CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS.....	78

PRIMEIRA PARTE

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

As formigas cortadeiras *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) são uma das principais pragas dos setores agrícola e florestal brasileiro, sendo considerada parte limitante para a produtividade. Estas formigas são um dos principais problemas enfrentados por silvicultores, e é necessário um constante monitoramento, pois estes insetos possuem o hábito de forrageamento que dura praticamente todo o ano, podendo causar danos como a desfolha total e consecutiva de culturas (DELLA LUCIA, 2011).

O hábito de forrageamento é devido à necessidade de fornecer material vegetal ao fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* que cultivam no interior das colônias. Em troca, o fungo disponibiliza constantemente alimento e nutrientes às formigas. Além dos nutrientes disponibilizados pelo fungo, estas se alimentam também de seiva das plantas durante o forrageamento (SILVA *et al.*, 2003). O fungo necessita de grande quantidade de material vegetal e, após o corte, as forrageadoras transportam o material vegetal fresco para o interior das colônias, incluindo flores, frutos, brotos, folhas e caules (WILSON, 1986).

Estima-se que os danos causados por formigas cortadeiras possam chegar a cerca de 1,8 milhões de hectares para pinus, 3,4 milhões de hectares para eucalipto e 326 mil hectares para outras culturas (PEREIRA; SANTOS, 2008). Quando se fala em dano econômico, estimativas apontam que os prejuízos causados por desfolha em culturas de eucalipto podem chegar a cerca de U\$ 8,26 por árvore desfolhada e as perdas anuais podem chegar a 1,2 bilhão de árvores, com média de quatro saúveiros adultos por hectare (DELLA LUCIA, 2011).

O controle químico de formigas cortadeiras é o método mais amplamente utilizado, por ser considerado o mais eficiente dentre os sistemas de controle disponíveis. Os métodos líquidos termonebulizáveis e as iscas formicidas são os mais comumente empregados, em razão da sua eficiência e operacionalidade (BOARETTO, MAC; FORTI, 1997; DELABIE, JACQUES, 1989; DELLA LUCIA, 2011).

Apesar da ampla utilização dos métodos químicos estes apresentam potencial risco de bioacumulação no solo e em lençóis freáticos além do risco de ação em organismos não alvo (BEDOR *et al.*, 2009). Outra grande preocupação acerca da utilização dos defensivos químicos é que a sulfluramida, um dos principais ingredientes ativos de iscas formicidas tóxicas encontra-se no grupo do Ácido Perfluorooctano Sulfônico (PFOS), fazendo de um grupo de novas substâncias com propriedades tóxicas peculiares, tanto para o meio ambiente, quanto para a saúde humana. E este foi adicionado em maio de 2009 ao anexo B da

Convenção de Estocolmo sobre os POPs (CONVENTION, 2009). O Brasil é o único país que utiliza a sulfluramida para iscas formicidas, fornecendo o material para outros países da América Latina que necessitam realizar o controle de formigas cortadeiras. Ainda não se possui nenhum substituto viável para a sulfluramida, desta forma, o MAPA enviou uma solicitação de registro de Finalidade Aceitável ao Secretariado da Convenção, solicitando a permissão do uso de sulfluramida apenas nas iscas formicidas (MMA, 2014a).

A busca por novos métodos de controle para formigas cortadeiras alternativos aos métodos químicos encontra-se sob intensa pesquisa, visando estratégias menos agressivas ao meio ambiente e aceitável em termo de eficiência no controle desta praga (DELLA LUCIA, 2011). O *Bacillus thuringiensis*, também é uma alternativa em potencial, pois se trata de um método considerado ambientalmente seguro e de alta eficiência já estudada para diversas ordens de insetos praga (FRANKENHUYZEN, 2009; LIMA *et al.*, 2012). Este é um dos principais microrganismos utilizados no controle biológico e sua aplicação vem ganhando cada vez mais impulso, devido à necessidade da implementação de métodos agrícolas mais seguros e menos danosos ao meio ambiente (MELO; SOCCOL; SOCCOL, 2016). Em sua fase de esporulação, as linhagens de *B. thuringiensis* são capazes de produzir cristais inseticidas. Estes cristais consistem em proteínas codificadas por diferentes genes, tais como os gene que codificam às proteínas crystal (*cry*), proteínas cytotoxicas (*cyt*), proteínas de estado vegetativo (*vip*) e a thuringiensina (β -*exotoxina*) (BRAVO; GILL; SOBERON, 2007; VAN BELKUM *et al.*, 1998).

Os produtos obtidos através do *B. thuringiensis* podem ser através de linhagens de plantas transgênicas ou por meio de formulações. As formulações são compostas por uma mistura de células de esporos e cristais, enquanto as linhagens transgênicas são provenientes da possibilidade da expressão dos genes inseticidas em organismos recombinantes heterólogos (CAPALBO; ARANTES; SUZUKI, 2005). Atualmente, as subespécies de *B. thuringiensis* representam cerca de 98 % dos pesticidas microbianos pulverizáveis formulados (BRAVO *et al.*, 2011).

O RNA interferente (RNAi) vem sendo frequentemente estudado para o controle de insetos praga, por ser um método altamente específico dependente de uma sequência que, geralmente, é direcionada a um único gene. Desta forma, a alta especificidade reduz o impacto negativo produzido pelos inseticidas de amplo espectro e preserva a fauna benéfica na área de cultivo (JOGA *et al.*, 2016; KHAJURIA *et al.*, 2015). O RNAi é um mecanismo de silenciamento pós-transcricional e sua capacidade de silenciamento foi descrita pela primeira vez no nematoide *Caenorhabditis elegans*, onde o percussor do silenciamento foi determinado

como um RNA dupla fita (dsRNA) (FIRE, A. *et al.*, 1998). Atualmente esta tecnologia tem sido uma ferramenta eficaz nos estudos genômicos funcionais e no manejo de pragas (ANDRADE; HUNTER, 2016). Inclusive, já foi anunciada uma cultura geneticamente modificada contendo um evento para o controle de insetos baseado em RNAi. Este evento foi o milho transgênico MON87411 contendo uma construção de *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) (EPA, 2014).

Um dos métodos de produção de dsRNA recentemente estudados é a produção via bactérias, pois é considerado um método mais econômico, uma vez que a produção de dsRNA *in vitro* via kits é altamente onerosa (JOGA *et al.*, 2016; RAMPADARATH; PUCHOOA; BAL, 2015). A bactéria *Escherichia coli* linhagem HT115 (DE3) possui uma mutação no gene codificador da RNase III, além de apresentar uma alta taxa de crescimento, reter plasmídeos e possuir o gene codificador da RNA polimerase T7, desta forma estas bactérias têm a capacidade de gerar dsRNA e contém o promotor T7 (POSIRI; ONGVARRASOPONE; PANYIM, 2013). Diversas pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de aperfeiçoar a produção de produtos a base de RNAi, que sejam de baixo custo e prontos para pulverizar (JOGA *et al.*, 2016).

A utilização do *B. thuringiensis* e do RNAi contra formigas cortadeiras ainda é pouco estudada, entretanto, devido ao alto potencial destas técnicas para o controle de insetos o objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de oito cepas de *B. thuringiensis* contra operárias forrageadoras de *Atta sexdens* e utilizar o RNAi proveniente construções de linhagens de bactérias *E. coli* HT115 (DE3) com o gene V-ATPase A para avaliar a taxa de mortalidade de operárias de *Atta sexdens* em laboratório.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Formigas cortadeiras do gênero *Atta*

O sucesso ecológico das formigas cortadeiras perdura a mais de 50 milhões de anos (MUELLER, 2002) e um dos principais fatores que levam a existência de muitas populações é a relação de simbiose com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (SCHADE, 1973). As formigas cortadeiras apresentam uma capacidade de selecionar o material vegetal a ser cortado e o sucesso destas formigas está ligado ao seu comportamento eusocial, o que permite que as formigas evitem o contato com competidores e predadores (HUBBELL; WIEMER, 1983).

As formigas *Atta ssp.* (Hymenoptera: Formicidae) atacam principalmente florestas de pinus e eucalipto, entretanto também pode atacar culturas cultivadas no geral (MARICONI, 1970) e também destacam-se por sua ampla distribuição podendo ser encontradas do Sul dos Estados Unidos ao Centro da Argentina (DELABIE *et al.*, 2011). No Brasil, podem ser encontradas principalmente nas regiões centro e centro-sul do país (DELLA LUCIA, 1993).

As saúvas possuem uma coloração que pode variar do marrom escuro ao vermelho; as operárias medem entre 12 mm e 15 mm, possuindo três pares de espinhos no mesossoma; na espécie *Atta sexdens* a cabeça é bastante pilosa, até mesmo em áreas laterais (MARICONI, FRANCISCO DE ASSIS MENEZES, 1971). A distribuição morfológica do sistema de castas e sub-castas de operárias é bastante visível: as jardineiras são consideradas as operárias mínimas e cuidam do fungo simbiote; as generalistas, com tamanho intermediário, tem a função de reconstrução do jardim do fungo e degradação do material vegetal, além de cuidados com a rainha e transporte de outras operárias; as forrageadoras, que também possuem um tamanho intermediário, transportam o material vegetal para dentro da colônia; e, por fim, os soldados são as operárias maiores e tem a função de defesa da colônia (WILSON, 1980).

Novas colônias são formadas nos períodos conhecidos como revoada, que ocorrem anualmente, geralmente após 38 meses da fecundação tendo como consequência a liberação de içás e bitus que são conhecidas como formigas sexuadas aladas. As içás serão as futuras rainhas e são fecundadas em pleno voo, descendo ao solo para cavar novas colônias. As içás carregam em sua cavidade infrabucal uma pequena quantidade do fungo trazido da colônia anterior, com o objetivo de iniciar uma nova colônia. Após a fecundação, a içá começa o trabalho de escavação da nova colônia, cavando pequenos canais que darão início à construção das câmaras (AUTORI, 1942). Terminando o trabalho de escavação, a içá regurgita o fungo presente em sua cavidade infrabucal para iniciar o seu cultivo (DELLA LUCIA *et al.*, 1995). A içá é responsável por cuidar da colônia nos próximos 90 dias e, após 60 dias, as primeiras operárias começam a emergir, auxiliando a rainha em seus diversos trabalhos e na expansão da colônia (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

As espécies vegetais coletadas pelas formigas cortadeiras podem ser de uma infinidade de plantas, o que caracteriza as formigas como insetos polívoros (NORTH; JACKSON; HOWSE, 1997). O aspecto de escolha dos materiais vegetais cortados pode ser influenciado por diversos fatores, tais como a identificação de compostos secundários tóxicos nas plantas ou até mesmo compostos com potencial de redução da digestibilidade, como é o caso dos taninos (SANTANA; COUTO, 1990). Outro fator de escolha para a seleção do material

vegetal é o odor das plantas, onde as formigas cortadeiras usam pistas de odor como critério para decidir qual material cortar ou não (DELLA LUCIA, 2011).

Após a seleção do material vegetal, as forrageadoras realizam o corte para que esse material seja transportado para o interior da colônia. As forrageadoras transportam praticamente todo o material vegetal fresco para o interior da colônia para suprir as necessidades do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* que cultivam no interior da colônia (DELLA LUCIA, 2011; WILSON, 1986).

A relação entre as formigas cortadeiras e o fungo cultivado no interior das colônias é uma relação de simbiose, baseada principalmente na troca de nutrientes entre os organismos participantes dessa relação (DE SIQUEIRA *et al.*, 1998). A interação entre formigas e fungo não é uma interação recente (MUELLER, 2002). Bass e Cherret (1996) analisaram a estrutura do fungo *L. gongylophorus* e verificaram nas câmaras que os jardins de fungo são os responsáveis pela produção de gongilídeos, estruturas responsáveis pelo fornecimento de alimentos para as formigas. O fungo ainda não foi encontrado livremente na natureza, estando presente apenas em colônias e sendo disseminado apenas pelas rainhas em épocas de revoada (WEBER, 1972).

O material vegetal coletado é preparado pelas operárias, onde inicialmente ocorre uma fragmentação e maceração do material vegetal, após estes processos ocorre um depósito de fluido fecal e inoculação do material no fungo (STAHEL, 1943). O fungo é fonte de alimento tanto para operárias quanto para larvas e é capaz de suprir as necessidades nutricionais destas, sendo o nutriente mais importante provindo da degradação de amido e celulose realizados pelas enzimas fúngicas (SILVA, 2004).

As formigas cortadeiras são consideradas herbívoras dominantes na região Neotropical e alimentam-se basicamente da seiva de plantas e do fungo. Desta forma, ao preparar as plantas para incorporação no jardim de fungo, as forrageadoras ingerem a seiva e acumulam carboidratos suficientes para suas necessidades nutricionais diárias (BASS; CHERRETT, 1996; QUINLAN; CHERRETT, 1979). As formigas do gênero *Atta ssp.* exibem preferência de 22% a 31% das plantas que exploram, entretanto elas selecionam e cortam o material vegetal de acordo com suas características nutricionais, o teor de água e a dureza do material vegetal (CHERRETT; POWELL; STRADLING, 1989; ROCKWOOD, 1976). O Pinus e o Eucalipto são as principais espécies florestais que mais sofrem danos devido ao ataque de formigas cortadeiras, sendo que estas podem atacar em qualquer estágio de desenvolvimento destas espécies arbóreas (MATRANGOLO *et al.*, 2014).

As rainhas alimentam-se basicamente do fungo e recebem nutrientes das formigas operárias via trofalaxia (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). As larvas são alimentadas pelas operárias adultas com os gongilídeos, que são ricos em proteínas (MUELLER *et al.*, 2001). As operárias são responsáveis por coletar os estáfilos, sugar os nutrientes líquidos e passar o restante para as larvas, que possuem enzimas capazes de degradar as paredes celulares das hifas. As larvas possuem mandíbulas com espinhos que perfuram as células do micélio e as auxiliam a se alimentar do fungo, aproveitando ao máximo o alimento (DELLA LÚCIA; BENTO, 1993). As operárias alimentam-se de exudados liberados durante o corte e manipulação das folhas (LITTLE; CURRIE, 2007). O alimento após ser coletado pelas operárias permanece por cerca de 24 horas na cavidade infrabucal, onde ocorre uma retenção de partículas sólidas (FOWLER *et al.*, 1991).

A cavidade infrabucal é composta por uma espécie de filtro de pequenas cerdas que são capazes de reter o material sólido (DE JESUS; BUENO, 2007). Operárias mínimas de *Acromyrmex octospinosus* possuem uma capacidade de filtração de partículas de até 10 µm durante a ingestão de alimentos líquidos, enquanto operárias de *Solenopsis invicta* podem filtrar partículas de cerca 1,8 µm (GLANCEY *et al.*, 1981). Em operárias de *A. sexdens* as partículas retidas podem ser de até 2µm de diâmetro (BUENO, O C, 2005).

A morfologia do intestino de adultos do gênero *Atta* se difere apenas pelas variações de tamanho entre as diferentes castas, e este é composto pela faringe, cavidade bucal, esôfago, proventrículo, ventrículo, papo, intestino posterior, reto e ânus (CAETANO, 1984). O pH do intestino é uma propriedade importante para o entendimento da digestão em formigas cortadeiras. Ensaio *in vivo* verificaram que o pH no papo e no intestino médio de formigas cortadeiras pode variar entre 7 e 8 (BOYD; MARTIN, 1975) e o processo digestivo consiste na obtenção de nutrientes, onde ocorre a transformação de macromoléculas (proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos, lipídeos e vitaminas) em moléculas menores (aminoácidos e monossacarídeos), que são absorvidas pelo intestino médio (DELLA LUCIA, 2011). As enzimas digestivas das larvas são eficientes em digerir lipídeos e proteínas, enquanto as enzimas digestivas dos adultos digerem principalmente carboidratos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

2.2 Ataque e controle de formigas cortadeiras.

As formigas cortadeiras são consideradas as principais pragas florestais brasileiras, sendo capazes de cortar brotos, flores, folhas e galhos, causando perdas diretas e indiretas no

desenvolvimento das árvores, como, por exemplo, a diminuição do tamanho e a diminuição da resistência a outros insetos e alguns patógenos (FERREIRA, 1989; MARICONI, FRANCISCO DE ASSIS MENEZES, 1971).

Os três primeiros anos de idade da planta são onde as formigas cortadeiras são mais prejudiciais, e após esse período, uma planta de eucalipto pode sofrer uma desfolha total e consecutiva (MATRANGOLO *et al.*, 2014). Uma única colônia é capaz de reduzir o crescimento em 5% das plantas de Eucalipto e 10% de plantas de Pinus, e tais estimativas representam uma redução de aproximadamente 2,1% na produção anual da madeira (MENDES FILHO, 1981).

Mudas de *Pinus taeda* com 30 dias de idade e sofrendo 100% de desfolhação por formigas cortadeiras demonstraram, em um ano, perdas de 13,3% em altura e 20% de diâmetro em relação a espécies não atacadas, enquanto mudas de *Eucalyptus grandis* apresentaram perdas em altura com apenas 3 meses de idade (REIS FILHO *et al.*, 2011; ZANETTI *et al.*, 2014). Os danos causados por formigas cortadeiras evidenciam a conseqüente queda na produção e no faturamento, sendo que esta queda é acentuada de acordo com a frequência da desfolhação, o que pode tornar a manutenção de áreas com desfolha total praticamente inviável (DOS SANTOS, ARTHUR, 2017).

Em decorrência da grande importância econômica e dos ataques causados por formigas cortadeiras, estas têm sido alvo de diversos estudos visando seu controle. As técnicas para controlar as formigas cortadeiras variam desde técnicas simples e caseiras passadas de geração em geração, até técnicas robustas e de alta tecnologia (DELLA LUCIA; VILELA, 1993). Dentre os métodos para controlar as formigas cortadeiras destacam-se o controle químico, controle mecânico, controle cultural e o controle biológico (ZANETTI *et al.*, 2014). Entretanto, o controle mecânico não é comumente utilizado, pois é aplicado somente em pequenas áreas e em colônias de apenas quatro meses de idade (BOARETTO; FORTI, 1997).

O controle químico é o método mais utilizado em áreas florestais, feito principalmente através do uso de inseticidas químicos (ZANUNCIO *et al.*, 2002). Dentre os métodos químicos são encontradas as formulações em pó, líquidas ou líquidas nebulizáveis e as iscas granuladas tóxicas (BOARETTO, MAC; FORTI, 1997). O conhecimento acerca do modo de ação dos inseticidas é essencial. O Comitê de Ação para Resistência a Inseticidas (IRAC) classifica os inseticidas a partir de seu modo de ação (BASF, 2013).

As iscas granuladas tóxicas são consideradas o método mais eficiente, econômico e prático de controle das formigas cortadeiras, sendo os ingredientes ativos mais utilizados a

sulfluramida, o fipronil, o fenitrothion e a deltametrina (MAPA, 2013a; TEIXEIRA; SANTOS, 2008). A sulfluramida (N-etil perfluooctano sulfonamida) e seu potencial de controle foram descobertos quando estes foram usados como surfactante para formulações tóxicas contra formigas Solenopsisini, demonstrando um retardo na toxicidade para trabalhadores desta espécie (VANDER MEER; LOFGREN; WILLIAMS, 1985). O metabólito N-etil perfluorooctano sulfonamida age no organismo afetando a fosforilação oxidativa, interrompendo a síntese de ATP. Desta forma, no momento em que as formigas transportam a sulfluramida para o interior da colônia em forma de iscas tóxicas cerca de 60% das operárias se contaminam com a substância e, como consequência, a colônia entra em colapso, interrompendo sua atividade (FORTI *et al.*, 1993).

Dos novos grupos químicos que vem se mostrando eficientes no controle de formigas cortadeiras destaca-se o fipronil, que é um fenil-pirazól que atua diretamente no sistema nervoso central do inseto (BOARETTO, M A C; FORTI, 1997). O fipronil foi desenvolvido em 1987 por Rhône-Poulenc e utilizado comercialmente em 1993 (RHÔNE-POULENC, 1995) e surgiu a partir de uma necessidade de inovação, pois na década de 1980 diversos insetos-praga haviam desenvolvido resistência à alguns inseticidas já formulados tais como os organofosforados, piretroídes e carbamatos (ALYOKHIN *et al.*, 2008). O fipronil está entre um terço do mercado mundial de inseticidas, na classe dos inseticidas sistêmicos, pois atuam interrompendo a transmissão neural no sistema nervoso central dos invertebrados, levando os invertebrados alvo a morte (SIMON-DELSO *et al.*, 2015).

Os sítios de ligação do fipronil estão relacionados aos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) (SIMON-DELSO *et al.*, 2015). Os antagonistas dos canais de cloro mediados por GABA atuam como bloqueadores da entrada de cloro nas células nervosas (OMOTO, 2000). O GABA é um neurotransmissor que possui a função de transmitir sinais que inibem a atividade de células pós-sinápticas o que, em certo grau, é essencial para o bom funcionamento do organismo. Entretanto, se esta inibição ocorrer de forma constante o organismo é levado a superestimulação e convulsão. Os principais antagonistas dos canais de cloro são os organoclorados e o fenilpirazóis (BASF, 2013).

Apesar da grande utilização de defensivos químicos, estes trazem alguns problemas relacionados ao seu uso, tais como seu potencial de bioacumulação no solo e em lençóis freáticos e problemas com organismos não alvos (BEDOR *et al.*, 2009). Além disso, o uso constante de inseticidas químicos vem sendo frequentemente questionado, o que tem aumentado a demanda por produtos ambientalmente seguros (DA SILVA ARAÚJO *et al.*, 2015). Um dos fatores que leva a uma preocupação referente ao uso de produtos químicos é

que em 2004 o Brasil tornou-se signatário da Convenção de Estocolmo sobre os Produtos Orgânicos Persistentes (POPs), no qual o uso e a comercialização de alguns produtos químicos foram proibidos. Dentre os agentes controladores de formigas encontram-se o endossulfam, que estava liberado apenas para o uso no controle de formigas até o ano de 2010, entretanto após este ano todos os usos do endossulfam foram banidos após uma revalidação toxicológica realizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (MMA, 2014a). Outro agente de controle de formigas proibido foi o Mirex (dodecacloro), que teve o seu uso para fins agropecuários proibido pelo MAPA em 1985, sendo admitidos apenas para o uso formicida. Contudo, a permissão para o uso formicida foi revogada em 1992, no qual como alternativa o dodecacloro foi substituído pela sulfluramida, que hoje tem sua comercialização como o Mirex-s (MMA, 2013c).

A sulfluramida é o composto que possui as características necessárias para uma boa funcionalidade da isca, entretanto encontra-se no grupo do Ácido Perfluorooctano Sulfônico (PFOS), sendo que este faz parte de um grupo de novas substâncias com características tóxicas peculiares, tanto para o meio ambiente, quanto para a saúde humana. Foi adicionado ao anexo B da Convenção de Estocolmo sobre os POPs em maio de 2009 (CONVENTION, 2009; DE BRITTO *et al.*, 2016; MMA, 2014a). O Brasil é o único país que produz a sulfluramida para iscas formicidas, e este produto é utilizado por todos os estados do país e alguns países da América Latina. Como o Brasil ainda não possui nenhum substituto viável para a sulfluramida, o MAPA enviou uma solicitação de registro de Finalidade Aceitável ao Secretariado da Convenção, solicitando a permissão do uso de sulfluramida apenas nas iscas formicidas (MMA, 2014a).

Alguns métodos podem ser alternativos ao controle químico, como por exemplo, o uso de produtos naturais e o controle biológico (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011). Zhang; Li e Miao (2013) ainda ressaltam a técnica de silenciamento gênico a partir de RNA de interferência como uma alternativa em potencial para o controle de pragas.

2.3 *Bacillus thuringiensis*

O controle biológico é considerado um método de controle de pragas promissor, e surgiu como alternativa ao uso de produtos químicos devido a sua alta eficiência e baixo risco de contaminação no meio ambiente (LIMA, *et al.*, 2012). O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva, formadora de cristais proteicos durante a fase de esporulação (BRAVO *et al.*, 2002), podendo ser encontrado principalmente no solo, em insetos mortos e

também em material vegetal (VALICENTE; BARRETO, 2003; VALICENTE *et al.*, 2010). O alto interesse agrônômico e científico acerca da atividade entomopatogênica do *B. thuringiensis* é devido a sua capacidade de colonizar uma vasta gama de hospedeiros e possuir alto grau de especificidade (DE MAAGD *et al.*, 2000).

Em sua fase de esporulação, as linhagens de *B. thuringiensis* são capazes de produzir cristais inseticidas, que consistem em proteínas codificadas por diferentes genes, denominadas Crystal (*cry*), Vegetativas (*vip*), Citolíticas (*cyt*), e a Thuringiensina (β -*exotoxina*). As proteínas Cry são as principais constituintes dos cristais, e o peso molecular destas pode variar entre 40 e 140 KDa (BRAVO; GILL; SOBERON, 2007). Até o ano de 1998 sua nomenclatura abrangia quatro classes de proteínas Cry (CryI, CryII, CryIII e CryIV). Entretanto, devido ao alto número de genes sequenciados, a classificação das proteínas Cry sofreu mudanças. Atualmente, a nomenclatura varia desde Cry1 ao Cry75 (CRICKMORE, 2018). O modo de ação das proteínas Cry se dá através da lise das células epiteliais do mesentério do organismo alvo, onde a solubilização das proteínas ocorre em pH alcalino, nas microvilosidades do intestino médio dos insetos, formando poros na célula (BRAVO *et al.*, 2002).

Os organismos alvo possuem receptores que são capazes de interagir com as proteínas Cry e esta interação é um dos principais fatores determinantes na especificidade da toxina (WOLFERSBERGER, 1990). Uma mesma linhagem de *B. thuringiensis* pode conter uma ou mais variações de genes que codificam as proteínas Cry e, desta forma, podem ser formados um ou mais cristais provenientes de uma mesma linhagem (ANDRADE ANGELO; TRINDADE VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

As proteínas Vip possuem modo de ação bastante similar às proteínas Cry, entretanto são sintetizadas em fase vegetativa e não são formadoras de cristais (ESTRUCH *et al.*, 1997). As proteínas Vip são promissoras no controle de pragas, pois possuem diferenças estruturais em relação as demais proteínas de *B. thuringiensis* (PINTO *et al.*, 2010). As proteínas Cyt são proteínas de atividade hemolítica que sofrem quebras em sua porção C-terminal e N-terminal, passando por processos de clivagem até sua forma de toxina ativa. Diferentemente das Cry, não se ligam a receptores, mas sim diretamente aos lipídeos da membrana, provocando a formação de poros (BRAVO; GILL; SOBERON, 2007).

Os produtos obtidos através do *B. thuringiensis*, podem ser as linhagens de plantas transgênicas ou as formulações, sendo que as formulações são compostas por uma mistura de células de esporos e cristais formados pelas proteínas Cry, enquanto as linhagens transgênicas provêm da possibilidade da expressão dos genes *cry* em organismos recombinantes

heterólogos (ARANTES; VILAS-BÔAS; VILAS-BÔAS, 2002; CAPALBO; ARANTES; SUZUKI, 2005). A produção de formulações de *B. thuringiensis* é baseada na escolha de uma linhagem que seja geneticamente estável e que apresente toxicidade ao inseto alvo (ANDRADE; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

As principais fases de produção de formulações à base de *B. thuringiensis* são a seleção das cepas eficientes, a estocagem, os processos fermentativos, a recuperação do princípio ativo, que são os esporos e os cristais e, por fim, a formulação do produto seguida pela análise de qualidade (COUCH, 2000; LIMA, URGEL *et al.*, 2001). A forma mais comum da produção de formulações é através da fermentação submersa descontínua, onde a fermentação ocorre em um recipiente contendo o meio de cultura líquido e o inóculo de microrganismos, sendo que ao final deste processo a cultura de *B. thuringiensis* possui cerca de 6% a 8% de sólidos, onde os esporos e cristais podem corresponder a até metade deste valor (BRAR *et al.*, 2006). Os métodos mais comuns de recuperação dos cristais e esporos são a centrifugação e a microfiltração (COUCH, 2000). No Brasil, a licença para o uso de bio produtos à base de *B. thuringiensis* é expedida pela ANVISA, mas antes da liberação esta agência solicita testes padrões que assegurem a segurança ambiental e a saúde humana (ANDRADE; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

A obtenção de culturas a base de *B. thuringiensis* é possível devido ao fato de que espécies diferentes possuem mecanismos equivalentes que são capazes de converter a informação genética contida no DNA em proteínas, ou seja, o seguimento de DNA de uma bactéria pode ser transcrito e traduzido em uma proteína funcional quando inserido em plantas (CAPALBO; ARANTES; SUZUKI, 2005).

Apesar do amplo espectro de ação de *B. thuringiensis* contra diversas ordens de insetos, a efetividade deste método no controle de formigas cortadeiras ainda é pouco conhecida. A atividade de *B. thuringiensis* já foi relatada para hymenopteros (BENZ; JOERESSEN, 1994). Dois isolados de *B. thuringiensis* foram encontradas e levaram a uma eficiência de até 100% no controle de *Acromyrmex spp.*, sendo estes isolados provenientes de amostras nativas de operárias de *Acromyrmex crassispinus* e *Acromyrmex lundi* (PINTO *et al.*, 2003). As cepas PS86Q3, PS14E2 e PS211B2 demonstraram toxicidade de cerca de 85% para a espécie de *Monomorium pharaonis*, mais conhecida como formiga-faraó (PAYNE *et al.*, 1997). A cepa PS86Q3 causou 35% de toxicidade em *Diprion pini*, um himenóptero-praga que ataca frequentemente culturas de *Pinus sp.* Estes trabalhos evidenciam a importância do *B. thuringiensis* como agente de controle biológico (GARCIA-ROBLES *et al.*, 2001).

2.4 RNA interferente

O RNA interferente (RNAi) consiste em um mecanismo biológico que leva ao silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) através da degradação do mRNA, que é mediado por pequenas moléculas de RNA dupla fita (CASTEL; MARTIENSSEN, 2013). Os pequenos RNAs compreendem 3 classes destacadas, os RNAs de cadeia curta (siRNAs), os microRNAs (miRNAs) e os RNAs de interação piwi (piRNAs) (SIOMI, 2009). Os siRNAs estão envolvidos na resposta de defesa do organismo contra RNAs dupla fita (*double-stranded RNA*) (dsRNAs) exógenos; os miRNAs participam de processos regulatórios de desenvolvimento celular e utilizam, principalmente, transcritos endógenos com a estrutura de um dsRNA; a função dos piRNA é promover o silenciamento de transposons, com o objetivo de assegurar a estabilidade de células germinativas (TOMARI; DU; ZAMORE, 2007).

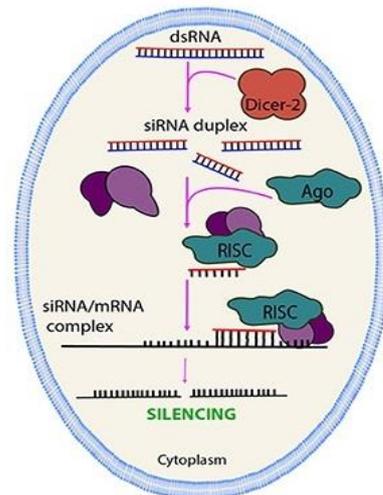
O fenômeno de RNAi foi descrito pela primeira vez em 1990 e foi denominado como co-supressão, sendo identificado através da introdução de cópias extras do gene *Chalcona sintase* (CHS) em plantas de petúnia com objetivo de se obter flores mais pigmentadas. Entretanto, os resultados obtidos foram contrários ao esperado, pois a introdução de cópias extras do gene resultou em flores variegadas e até mesmo totalmente brancas. Este fato pode ser explicado em função das cópias do gene da petúnia e as cópias do transgene terem sido suprimidas (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990).

O termo RNAi foi criado a partir de experimentos realizados no nematoide *Caenorhabditis elegans*, no qual inicialmente foi realizada a injeção das fitas senso e anti-senso do gene *unc22*, responsável pela contração muscular. Através deste trabalho pôde ser observado que os nematoides que receberam a injeção das fitas senso e anti-senso juntas, apresentaram mudanças fenotípicas como a movimentação desordenada devido a atividade de interferência dos dsRNA injetados (FIRE, A. *et al.*, 1998).

O mecanismo do RNAi pela via dos siRNAs é desencadeado a partir do uso dos dsRNAs, que após chegarem ao interior das células, estes são processados por RNAses do tipo III denominadas DICER, clivando tais moléculas em pequenos RNAs de interferência (siRNAs) com tamanhos entre 21 a 23 nucleotídeos (ELBASHIR; LENDECKEL; TUSCHL, 2001; FIRE, ANDREW *et al.*, 1998). A fita anti-senso (*guide strand*) é incorporada pelo complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-induced silencing complex* - RISC). Este complexo possui proteínas ARGONAUTAS como seu principal componente. Uma fita guia é utilizada pelo complexo RISC para encontrar os mRNAs homólogos, promovendo sua

degradação e um possível knockdown na expressão do gene (Figura 1) (HANNON, 2002; MEISTER; TUSCHL, 2004).

Figura 1 – Mecanismo mediado pela rota de siRNA celular no silenciamento de genes.



Legenda: O mecanismo de RNAi pela rota do siRNA ocorre quando o dsRNA entra em contato com o organismo, desta forma a Dicer cliva este dsRNA em pequenos RNAs de interferência, os siRNAs. A fita anti-senso deste siRNA é usada como fita guia e incorporada pelo complexo RISC com o objetivo de encontrar o mRNA homólogo ao dsRNA, promovendo sua degradação e um possível knockdown na expressão do gene.

Fonte: JOGA *et al.*, 2016 adaptado.

O RNAi pode ser dividido em RNAi de células autônomas, indicando que o silenciamento é limitado apenas à célula nas quais o dsRNA foi introduzido, este dsRNA atinge apenas o interior de células individuais; e o RNAi de células não-autônomas, que atinge diferentes células e tecidos a partir do local em que se foi introduzido o dsRNA (WHANGBO; HUNTER, 2008). O RNAi de células não-autônomas é o mais indicado no controle de insetos. Dentro da classificação do RNAi de células não-autônomas podem ser observados dois tipos de mecanismos: o RNAi ambiental, que é absorvido por uma célula a partir do ambiente; e o RNAi sistêmico, onde os sinais de silenciamento são transportados de uma célula a outra. Na maioria dos casos, o inseto inicialmente ingere o dsRNA homólogo ao gene alvo através da alimentação e este deve ser absorvido por outras células para que ocorra o silenciamento (HUVENNE; SMAGGHE, 2010).

O potencial do RNAi como forma de controle de insetos-praga vem se destacando nos últimos anos, principalmente devido a possibilidade de disponibilizar o dsRNA via ingestão (GU; KNIPPLE, 2013). Diversos trabalhos têm demonstrado a eficiência da técnica de RNAi para controle de pragas, e um destes trabalhos foi relacionado com o gene do *citocromo* P450

(*CYP6AE14*) encontrado em *Helicoverpa armigera*. Este gene foi correlacionado ao crescimento das larvas e a desintoxicação do metabólito secundário gossipol presente em plantas de algodão. Ao se alimentarem com dsRNAs homólogos ao gene *CYP6AE14* foi verificado que as larvas não conseguiram realizar a desintoxicação por gossipol, causando uma diminuição no tamanho do intestino médio dos insetos e um crescimento retardado das larvas (MAO *et al.*, 2007).

O gene *PBAN* de *Solenopsis invicta*, conhecida como formiga-de-fogo, também foi silenciado via RNAi. E está presente no sistema nervoso central dos insetos, e possui a função de ativar a biossíntese de feromônios (VANDER MEER; CHOI, 2013). A interferência na expressão dos genes alvo mediada por RNAi pode gerar diversos distúrbios em insetos-praga, sendo os principais o crescimento atrofiado dos insetos e consequente morte (THAKUR *et al.*, 2014).

O potencial de sucesso da técnica para o controle de insetos-praga deve levar em consideração diversos parâmetros, dentre eles a dose de dsRNA fornecida ao inseto, a forma de entrega da molécula e a identificação dos melhores alvos ao silenciamento (NANDETY *et al.*, 2015). Os genes escolhidos para o silenciamento devem ser alvos essenciais ao desenvolvimento do inseto ou envolvidos em rotas metabólicas chave (KHAN *et al.*, 2013). Graças às novas técnicas de sequenciamento de nova geração (*Next-generation Sequencing*) (NGS), como o RNA-seq e o Miseq, a geração e o processamento de dados transcriptômicos e genômicos podem ser realizados de forma mais rápida e eficiente, podendo facilitar no entendimento acerca de genes alvo a serem estudados (NANDETY *et al.*, 2015). A busca por genes alvo é de extrema importância para o controle insetos, uma vez que ao silenciar ou diminuir a expressão de genes chaves os insetos podem ser levados a morte.

2.5 ATPases Vacuolares (*VATPases*)

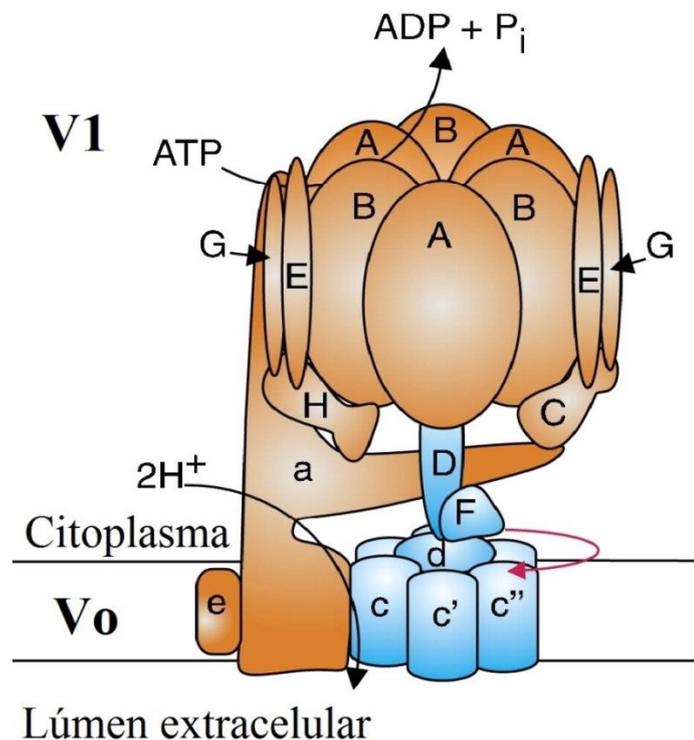
As ATPases vacuolares (V-ATPases) funcionam como bombas de prótons que são acionadas mediante a presença de ATP em uma ampla variedade de membranas celulares, podendo estas membranas ser os endossomos, lisossomos, vesículas de Golgi, vesículas secretoras e membranas plasmáticas de diversos tipos de células (FORGAC, 2007).

O complexo das V-ATPases é formado por dois domínios (V_1 e V_0), onde o setor V_1 encontra-se em contato com o citosol e possui a função de hidrolisar moléculas de ATP, enquanto o setor V_0 é o setor transmembrânico e está envolvido com a translocação de prótons através da bicamada lipídica (HURTADO-LORENZO *et al.*, 2006). O complexo das

V-ATPases atua no processo de acidificação do pH de ambientes extracelulares através do bombardeamento de prótons H^+ , ocorrendo do citoplasma para o lúmen das vesículas (MELLMAN, 1992).

As subunidades são bem organizadas. O setor V_1 é dividido em oito subunidades diferentes (A-H), que são responsáveis por hidrolisar o ATP. A estequiometria destas subunidades é composta em A_3 , B_3 , C_1 , D_1 , E_2 , F_1 , G_2 e H_{1-2} . O setor V_0 é composto pelas subunidades a, d, c, c', e c'' (ARAI *et al.*, 1988; COTTER *et al.*, 2015). As subunidades A_3 e B_3 estão dispostas em um hexâmetro, alternados com os locais de ligação de nucleotídeos localizados nas interfaces das regiões A e B, e é mais especificamente nesta região que ocorre a hidrólise do ATP. A energia gerada através da hidrólise do ATP é direcionada para que ocorra um giro no rotor composto pelas subunidades D, F, d, e, desta forma ocorrerá um giro nas subunidades c' e c'' (figura 2) (COTTER *et al.*, 2015; FORGAC, 2007).

Figura 2 – Estrutura e mecanismo rotativo da V-ATPase.



Legenda: Mecanismo rotativo da V-ATPase. A hidrólise do ATP, que ocorre em V_1 , causa alterações nas unidades conformacionais nas subunidades A que, por sua vez, ativam a rotação do rotor no domínio V_0 , promovendo a translocação de prótons H^+ através da bicamada lipídica.

Fonte: CIPRIANO *et al.*, 2008 adaptado.

A rotação das subunidades irá permitir com que ocorra uma entrada de prótons H^+ para o lúmen extracelular através dos canais presentes na subunidade a. As subunidades EGH

e EGC possuem a finalidade de manter as subunidades AB do domínio V_1 ligadas à subunidade presente em V_0 (COTTER *et al.*, 2015).

Pequenas quantidades de dsRNA homólogas as subunidades de V-ATPase A e D incorporadas à dieta artificial foram capazes de reduzir os níveis de mRNA e levar larvas de *Diabrotica virgifera virgifera* a morte (BAUM *et al.*, 2007). Em estudos realizados com plantas de tabaco expressando dsRNA homólogos ao gene da V-ATPase A foi possível constatar que estas causaram uma mortalidade entre 48% e 62% em adultos da mosca branca *Bemisia tabaci* (THAKUR *et al.*, 2014). Upadhyay *et al.* (2011) observaram elevada taxa de mortalidade em *B. tabaci* alimentadas com dieta contendo dsV-ATPase A após seis dias de bioensaio.

Os resultados dos estudos relacionados ao complexo da V-ATPase enfatizam sua importância no contexto celular, tendo em vista que a tecnologia do RNAi pode impactar na sobrevivência de insetos e, conseqüentemente, auxiliar em seu controle. As alterações nos níveis de expressão deste gene podem afetar o metabolismo energético das células, tendo como resultado um desbalanceamento de prótons na célula. O desbalanceamento de prótons pode gerar modificações nas condições favoráveis de pH necessárias para o funcionamento de vesículas e do tráfego de moléculas através da membrana. Os genes da V-ATPase são considerados candidatos potenciais ao silenciamento gênico em formigas cortadeiras *Atta sexdens* devido a sua importância para o funcionamento do organismo.

2.6 Bactérias *Escherichia coli* linhagem HT115 (DE3) como produtoras de dsRNA

O método de entrega do dsRNA ao inseto ainda vem sendo bastante discutido, podendo ser feita via injeção ou ingestão, entretanto a injeção pode implicar problemas na interpretação dos resultados, uma vez que a própria injeção pode causar variações na fisiologia do animal (RATZKA *et al.*, 2011). A alimentação de insetos com bactérias que expressem o dsRNA homólogo ao gene alvo pode ser adotada para diversas ordens de insetos, uma vez que o método é mais rentável (ZHU *et al.*, 2011), alguns fatores devem ser observados, onde as bactérias e o dsRNA devem ser absorvidos em concentração suficiente para causar efeitos no inseto alvo, outro fator a ser observado é que a espécie de inseto em teste deve aceitar se alimentar das bactérias, caso contrário o dsRNA precisa ser extraído da bactéria antes da alimentação ou sintetizado *in vitro*, o que torna o processo muito mais caro (RATZKA; GROSS; FELDHAAR, 2013).

Ainda são discutidos os métodos de entrega de dsRNA aos insetos alvo, podendo a entrega de um produto final ser via o desenvolvimento de culturas transgênicas expressando dsRNA ou uma alternativa não transgênica, no qual envolveria a aplicação tópica ou o incremento de iscas, entretanto esta última abordagem requer uma grande quantidade de dsRNA para ser eficaz (ZHANG; LI; MIAO, 2013). O dsRNA pode ser sintetizado *in vitro* via kits, porém além de ser um processo que torna o método oneroso, este não é um meio prático para a produção de dsRNA, sendo necessários aplicativos em larga escala. Desta forma é necessário um método econômico de produção de dsRNA em larga escala para a implementação da tecnologia em campo (AHN *et al.*, 2019).

A produção de dsRNA via bactérias é uma alternativa sustentável para produção em grandes quantidades (NEWMARK *et al.*, 2003). Além de ser de fácil manuseio, as bactérias *E. coli* linhagem HT115 (DE3) possuem alta taxa de crescimento, além de reter plasmídeos e possuir o gene codificador da polimerase T7, sendo assim possuem a capacidade de gerar dsRNA a partir de plasmídeos duplos contendo o promotor T7 (POSIRI; ONGVARRASOPONE; PANYIM, 2013; THAMMASORN *et al.*, 2015; TIMMONS; COURT; FIRE, 2001). Esta cepa bacteriana possui uma mutação no gene codificador da RNase III, que confere as características necessárias a produção e expressão de dsRNAs (ONGVARRASOPONE; ROSHORM; PANYIM, 2007).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Ainda não foram identificados métodos de controle efetivos alternativos ao químico para formigas cortadeiras. Levando em consideração os danos causados por este inseto-praga e os impactos trazidos tanto ao meio ambiente quanto ao homem devido a utilização de inseticidas químicos. O *B. thuringiensis* e o RNA interferente podem ser considerados ferramentas promissoras para o controle. Os resultados obtidos neste trabalho podem auxiliar em um melhor entendimento sobre estes mecanismos em formigas cortadeiras.

REFERÊNCIAS

AHN, Seung-Joon *et al.* Microbial-Based Double-Stranded RNA Production to Develop Cost-Effective RNA Interference Application for Insect Pest Management. **International Journal of Insect Science**, v. 11, p. 1179543319840323, 2019.

ALYOKHIN, Andrei *et al.* Colorado potato beetle resistance to insecticides. **American Journal of Potato Research**, v. 85, n. 6, p. 395–413, 2008.

ANDRADE ANGELO, Elisângela; TRINDADE VILAS-BÔAS, Gislayne; CASTRO-GÓMEZ, Raúl Jorge Hernan. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, 2010.

ANDRADE, C E; HUNTER, Wayne B. RNA interference–natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC). **RNA interference**, p. 391–409, 2016.

ARAI, H *et al.* Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 18, p. 8796–8802, 1988.

ARANTES, O M N; VILAS-BÔAS, L A; VILAS-BÔAS, G T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. **Biotecnologia: Avanços na agricultura e agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS**, v. 2, p. 269–293, 2002.

AUTORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta spp.*) 3. Excavacao de un saúverio. *Atta sexdens*, p. 137–148, 1942.

BASF. Insecticide Mode of Action. **USA** 2013.

BASS, M; CHERRETT, J M. Fungus garden structure in the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Formicidae, Attini). **Symbiosis (Philadelphia, Pa.)**(USA), 1996.

BAUM, James A *et al.* Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1322, 2007.

BEDOR, Cheila Nataly Galindo *et al.* Vulnerabilidades e situações de riscos relacionados ao uso de agrotóxicos na fruticultura irrigada. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 12, p. 39–49, 2009.

BENZ, G; JOERESSEN, H J. A new pathotype of *Bacillus thuringiensis* with pathogenic action against sawflies (Hymenoptera, Symphyta). **Bulletin OILB SROP (France)**, 1994.

BOARETTO, M A C; FORTI, L C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série técnica IPEF**, v. 11, n. 30, p. 31–46, 1997.

BOYD, Norman D; MARTIN, Michael M. Faecal proteinases of the fungus-growing ant, *Atta texana*: their fungal origin and ecological significance. **Journal of Insect Physiology**, v. 21, n. 11, p. 1815–1820, 1975.

BRAR, Satinder K *et al.* Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 323–342, 2006.

BRAVO, Alejandra *et al.* *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect**

biochemistry and molecular biology, v. 41, n. 7, p. 423–431, 2011.

BRAVO, Alejandra *et al.* N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 23985–23987, 2002.

BRAVO, Alejandra; GILL, Sarjeet S; SOBERON, Mario. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423–435, 2007.

BUENO, O C. Alimentação em formigas: Subisídios para o controle. In: Simpósio de Mirmecologia. **Simpósio de Mirmecologia**, p. 39–42, 2005.

CAETANO, Flávio Henrique. Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae). **Pap@ Weis avulsos de zoologia**, v. 35, p. 23, 1984.

CAPALBO, Deise Maria Fontana; ARANTES, O M N; SUZUKI, Marise T. *Bacillus thuringiensis*. **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2005.

CASTEL, Stephane E; MARTIENSSEN, Robert A. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 2, p. 100, 2013.

CHERRETT, J M; POWELL, R J; STRADLING, D J. The mutualism between leaf-cutting ants and their fungus. **Insect-fungus interactions**, p. 93–120, 1989.

CIPRIANO, Daniel J *et al.* Structure and regulation of the vacuolar ATPases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1777, n. 7–8, p. 599–604, 2008.

CONVENTION, Secretariat of the Stockholm. COP4-Governments unite to step-up regulation on global DDT reliance and add nine new chemicals under international treaty. **Geneva: Stockholm Convention Secretariat**, 2009.

COTTER, Kristina *et al.* Recent insights into the structure, regulation, and function of the V-ATPases. **Trends in biochemical sciences**, v. 40, n. 10, p. 611–622, 2015.

COUCH, Terry L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. *Entomopathogenic Bacteria: from laboratory to field application*. **Springer**, 2000.

CRICKMORE, Neil. *Bt Toxin Nomenclature*. Disponível em: <<http://www.btnomenclature.info/>>. Acesso em: 27 fev. 2020.

DA SILVA ARAÚJO, Márcio *et al.* Controle biológico de formigas-cortadeiras: o caso da

predação de fêmeas de *Atta spp.* por *Canthon virens*. **Journal of Neotropical Agriculture**, v. 2, n. 3, p. 8–12, 2015.

DE BRITTO, Júlio Sérgio *et al.* Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Research in Environmental Studies**, v. 3, p. 11–92, 2016.

DE JESUS, C M; BUENO, O C. Mesa redonda utilização de alimentos em diferentes espécies de formigas. **Biológico, São Paulo**, v. 69, n. suplemento 2, p. 107–110, 2007.

DE MAAGD, Ruud A *et al.* *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Cry1C Domain III Can Function as a Specificity Determinant for *Spodoptera exigua* in Different, but Not All, Cry1-Cry1C Hybrids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 4, p. 1559–1563, 2000.

DE SIQUEIRA, Célia Gomes *et al.* Metabolism of Plant Polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* L. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 12, p. 4820–4822, 1998.

DELABIE, J H C *et al.* Distribuição das formigas cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no Novo Mundo. Formigas Cortadeiras: da Bioecologia ao Manejo. *1ª edição. Viçosa-MG, Editora da Universidade Federal de Viçosa*, p. 80–101, 2011.

DELABIE, Jacques H C. Novas opções para controle das formigas cortadeiras *Acromyrmex subterraneus brunneus* e *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera: Formicidae: Attini), na região cacauieira da Bahia, Brasil. **Revista Agrotrópica**, v. 1, p. 173–180, 1989.

DELLA LUCIA, T M C De. *As formigas cortadeiras*. **Sociedade de Investigadores Florestais**, 1993. 262p., 1993.

DELLA LUCIA, T M C *et al.* Perda de peso de rainhas de *Atta* durante a fundação eo estabelecimento das colônias. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 55, n. 4, p. 533–536, 1995.

DELLA LUCIA, T M C; SOUZA, D J. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. *Formigas-Cortadeiras da biotecnologia ao manejo*. **Editora UFV. Viçosa, Brazil**, p. 13–26, 2011.

DOS SANTOS, ARTHUR, C et Al. Formigas cortadeiras na cultura do eucalipto. **Conexão Eletrônica**, v. 14, p. 535–547, 2017.

ELBASHIR, Sayda M; LENDECKEL, Winfried; TUSCHL, Thomas. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. **Genes & development**, v. 15, n. 2, p. 188–200, 2001.

EPA, U S. Transmittal of the meeting minutes of the FIFRA SAP meeting held January 28,

2014 on the scientific issues associated with the use of “RNAi technology as a pesticide: **problem formulation for human health and ecological risk assessment**, 2014.

ESTRUCH, Juan J *et al.* Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 137, 1997.

FERREIRA, Francisco Alves. Patologia florestal-principais doenças florestais no Brasil. **SIF Viçosa**, 1989.

FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998.

FORGAC, Michael. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 8, n. 11, p. 917, 2007.

FORTI, L C *et al.* Trofalaxia entre operárias-operárias e operárias-larvas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae), 1993.

FOWLER, H G *et al.* Ecologia nutricional de formigas. **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**, p. 131–223, 1991.

FRANKENHUYZEN, Kees Van. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 1, p. 1–16, 2009.

GARCIA-ROBLES, Inmaculada *et al.* Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 31, n. 9, p. 849–856, 2001.

GLANCEY, B Michael *et al.* Filtration of microparticles from liquids ingested by the red imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren. **Insectes Sociaux**, v. 28, n. 4, p. 395–401, 1981.

GU, Liuqi; KNIPPLE, Douglas C. Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies. **Crop Protection**, v. 45, p. 36–40, 2013.

HANNON, Gregory J. RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 244, 2002.

HÖLLDOBLER, Bert; WILSON, Edward O. **The ants**. Harvard University Press, 1990.

HUBBELL, S P; WIEMER, D F. *Host plant selection by an attine ant, Vol. 2. Social Insects in the Tropics*. University of Paris Press, Paris, France. , 1983

HURTADO-LORENZO, Andrés *et al.* V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. **Nature cell biology**, v. 8, n. 2, p. 124, 2006.

HUVENNE, Hanneke; SMAGGHE, Guy. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. **Journal of insect physiology**, v. 56, n. 3, p. 227–235, 2010.

JOGA, Mallikarjuna R *et al.* RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. **Frontiers in physiology**, v. 7, p. 553, 2016.

KHAJURIA, Chitvan *et al.* Parental RNA interference of genes involved in embryonic development of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 63, p. 54–62, 2015.

LIMA, Anna Carolina Carvalho *et al.* Diagnóstico sobre o uso do MIP nas principais áreas produtoras de melão dos Estados do Rio Grande do Norte e Ceará. **Revista Agro@ ambiente On-line**, v. 6, n. 2, p. 172–178, 2012.

LIMA, Urgel de Almeida *et al.* Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. **São Paulo: Edgard Blücher**, v. 3, p. 1–43, 2001.

LITTLE, Ainslie E F; CURRIE, Cameron R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant–microbe symbiosis. **Biology letters**, v. 3, n. 5, p. 501–504, 2007.

LIVRAMENTO, Kalynka *et al.* Gene expression profile analysis is directly affected by the selected reference gene: the case of leaf-cutting *Atta sexdens*. **Insects**, v. 9, n. 1, p. 18, 2018.

MAO, Ying-Bo *et al.* Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1307, 2007.

MAPA. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, 2013a.

MARICONI, Francisco A M. *As saúvas*. **Agronômica Ceres**. São Paulo, 1970.

MARICONI, Francisco de Assis Menezes. Inseticidas e seu emprego no combate às pragas. 1971.

MATRANGOLO, Carlos Augusto Rodrigues *et al.* Crescimento de eucalipto sob efeito de desfolhamento artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 9, p. 952–957, 2014.

MEISTER, Gunter; TUSCHL, Thomas. Mechanisms of gene silencing by double-stranded

RNA. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 343, 2004.

MELLMAN, I. The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. **Journal of Experimental Biology**, v. 172, n. 1, p. 39–45, 1992.

MELO, André Luiz de Almeida; SOCCOL, Vanete Thomaz; SOCCOL, Carlos Ricardo. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 317–326, 2016.

MENDES FILHO, J M A. Reunião técnica de combate as formigas. **Série Técnica–IPEF, Piracicaba**, v. 2, n. 7, p. 19, 1981.

MMA. Grupo de Trabalho Interinstitucional (GTI) do Plano Nacional de Implementação da Convenção de Estocolmo: **Inventário Nacional Preliminar de Estoques e Resíduos de Agrotóxicos POPs (documento preliminar)**, 2014a.

MMA. **Inventário Nacional Preliminar de Novos Poluentes Orgânicos Persistentes (Novos POPs) de Uso Industrial**, 2013c.

MUELLER, Ulrich G. Ant versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. **The american naturalist**, v. 160, n. S4, p. S67–S98, 2002.

MUELLER, Ulrich G *et al.* The origin of the attine ant-fungus mutualism. **The Quarterly Review of Biology**, v. 76, n. 2, p. 169–197, 2001.

NANDETY, Raja Sekhar *et al.* Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. **Bioengineered**, v. 6, n. 1, p. 8–19, 2015.

NAPOLI, Carolyn; LEMIEUX, Christine; JORGENSEN, Richard. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The plant cell**, v. 2, n. 4, p. 279–289, 1990.

NEWMARK, Phillip A *et al.* Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. suppl 1, p. 11861–11865, 2003.

NORTH, R D; JACKSON, C W; HOWSE, P E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, n. 10, p. 386–389, 1997.

OMOTO, Celso. Modo de ação de inseticidas e resistência de insetos a inseticidas. **Bases e técnicas do manejo de insetos**, 2000.

ONGVARRASOPONE, Chalermpon; ROSHORM, Yaowaluck; PANYIM, Sakol. A simple and cost effective method to generate dsRNA for RNAi studies in invertebrates. **Science Asia**, v. 33, n. 1, p. 35–39, 2007.

PAYNE, Jewel M *et al.* *Bacillus thuringiensis* toxins active against hymenopteran pests. **Google Patents**, 1997

PEREIRA, J M M; SANTOS, G P. Aspectos socioeconômicos do setor florestal brasileiro. **Informe Agropecuário, EPAMIG**, v. 29, p. 7–13, 2008.

PINTO, Laura Massochin Nunes *et al.* Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. **Conselho Científico**, v. 71503, p. 24, 2010.

PINTO, L M *et al.* Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae). **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 63, n. 2, p. 301–306, 2003.

POSIRI, Pratsaneeyaporn; ONGVARRASOPONE, Chalermpon; PANYIM, Sakol. A simple one-step method for producing dsRNA from E. coli to inhibit shrimp virus replication. **Journal of virological methods**, v. 188, n. 1–2, p. 64–69, 2013.

QUINLAN, R J; CHERRETT, J M. The role of fungus in the diet of the leaf cutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecological Entomology**, v. 4, n. 2, p. 151–160, 1979.

RAMPADARATH, Sillma; PUCHOOA, Daneshwar; BAL, Subhasisa. Repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) as a genetic tool to study interspecific diversity in Euphorbiaceae family. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 412–417, 2015.

RATZKA, Carolin *et al.* Immune response of the ant *Camponotus floridanus* against pathogens and its obligate mutualistic endosymbiont. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 8, p. 529–536, 2011.

RATZKA, Carolin; GROSS, Roy; FELDHAAR, Heike. Systemic gene knockdown in *Camponotus floridanus* workers by feeding of dsRNA. **Insectes sociaux**, v. 60, n. 4, p. 475–484, 2013.

REIS FILHO, Wilson *et al.* Danos causados por diferentes níveis de desfolha artificial para simulação do ataque de formigas cortadeiras em *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 31, n. 65, p. 37, 2011.

RHÔNE-POULENC, O. Atelier International Fipronil/lutte antiacridienne. Lyon 3-5 May 1995. **Unpublished report. Rhône-Poulenc Agrochimie, Lyon, France**, 1995.

ROCKWOOD, Larry L. Plant selection and foraging patterns in two species of leaf cutting ants (*Atta*). **Ecology**, v. 57, n. 1, p. 48–61, 1976.

RODRIGUES, A *et al.* Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 4, p. 604–614, 2008.

SANTANA, D L de Q; COUTO, Laércio. Resistência intra-específica de eucaliptos a formigas-cortadeiras. **Embrapa Florestas-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1990.

SCHADE, FRANCISCO H. ecology and control of the leaf-cutting ants of Paragua y. **Paraguay Ecological Essays**, 1973.

SILVA, Aline. Alfa-amilase e maltase nos simbiontes *Leucoagaricus gongylophorus* Singer (Möller)(Leucocoprineae: agaricaceae) e *Atta sexdens* Linnaeus (Attini: formicidae). 2004.

SILVA, Aline *et al.* Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 4, p. 307–313, 2003.

SIMON-DELISO, Noa *et al.* Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5–34, 2015.

SIOMI, Haruhiko; SIOMI, Mikiko C. On the road to reading the RNA-interference code. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 396, 2009.

STAHEL, G. The fungus gardens of the leaf-cutting ants. **JNY Bot. Gard**, v. 44, p. 245–253, 1943.

TEIXEIRA, Maria Lucia França; SANTOS, Marcus Nascimento. Atratividade da isca granulada de polpa de fruto do jatobá para saúva-limão, no campo. **Ciencia rural**, v. 38, n. 4, p. 907–911, 2008.

THAKUR, Nidhi *et al.* Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase A gene. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e87235, 2014.

THAMMASORN, Thitiporn *et al.* Large-scale production and antiviral efficacy of multi-target double-stranded RNA for the prevention of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. **BMC biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 110, 2015.

TIMMONS, Lisa; COURT, Donald L; FIRE, Andrew. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**, v. 263, n. 1–2, p. 103–112, 2001.

TOMARI, Yukihide; DU, Tingting; ZAMORE, Phillip D. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. **Cell**, v. 130, n. 2, p. 299–308, 2007.

TRAPNELL, Cole *et al.* Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature protocols**, v. 7, n. 3, p. 562, 2012.

UPADHYAY, Santosh Kumar *et al.* RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. **Journal of biosciences**, v. 36, n. 1, p. 153–161, 2011.

VALICENTE, Fernando H; BARRETO, Marliton R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 639–644, 2003.

VALICENTE, FERNANDO HERCOS *et al.* Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using commercial lab medium and agricultural by-products as nutrient sources. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 9, n. 01, p. 1–11, 2010.

VAN BELKUM, Alex *et al.* Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 2, p. 275–293, 1998.

VAN DIJK, Erwin L *et al.* Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in genetics**, v. 30, n. 9, p. 418–426, 2014.

VANDER MEER, Robert K; CHOI, Man Yeon. Formicidae (ant) control using double-stranded RNA constructs. **Google Patents.** , 5 nov. 2013

VANDER MEER, Robert K; LOFGREN, Clifford S; WILLIAMS, David F. Fluoroaliphatic sulfones: a new class of delayed-action insecticides for control of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of economic entomology**, v. 78, n. 6, p. 1190–1197, 1985.

WANG, Zhong; GERSTEIN, Mark; SNYDER, Michael. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**, v. 10, n. 1, p. 57, 2009.

WEBER, Neal A. Gardening ants, the attines Memoirs of the American Philosophical Society. **Philadelphia, PA**, 1972.

WHANGBO, Jennifer S; HUNTER, Craig P. Environmental RNA interference. **Trends in genetics**, v. 24, n. 6, p. 297–305, 2008.

WILSON, E O. The defining traits of fire ants and leaf-cutting ants. 1986.

WILSON, Edward O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 7, n. 2, p. 157–165, 1980.

WOLFERSBERGER, M G. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border

membranes for the toxins. **Experientia**, v. 46, n. 5, p. 475–477, 1990.

ZANETTI, Ronald *et al.* An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. **Forests**, v. 5, n. 3, p. 439–454, 2014.

ZANUNCIO, J C *et al.* Influência das iscas formicidas Mirex-S Max e Blitz na paralisação de corte e no controle de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Rev. Arvore**, v. 26, p. 237–242, 2002.

ZHANG, Hao; LI, Hai Chao; MIAO, Xue Xia. Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi based technology for insect pest control. **Insect science**, v. 20, n. 1, p. 15–30, 2013.

ZHU, Fang *et al.* Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. **Pest management science**, v. 67, n. 2, p. 175–182, 2011.

SEGUNDA PARTE

Artigos

ARTIGO 1 – *Bacillus thuringiensis* como ferramenta de controle de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)

Normas de formatação da ABNT (Versão preliminar)

Déborah Heloísa Bittencourt Machado¹, Wesley Pires Flausino Máximo¹, Ronald Zanetti²,
Fernando Hercos Valicente³; Luciano Vilela Paiva¹

¹ Laboratório Central de Biologia Molecular, Universidade Federal de Lavras (UFLA),
MG, Brasil;

² Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, Universidade Federal de Lavras (UFLA),
MG, Brasil;

³ Núcleo de Biologia Aplicada, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
(EMBRAPA), MG, Brasil;

RESUMO

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria entomopatogênica que produz proteínas tóxicas contra diversas ordens de insetos. A fim de identificar a patogenicidade de *B. thuringiensis* contra formigas cortadeiras *Atta sexdens*, oito cepas foram testadas em bioensaios de mortalidade via alimentação. As cinco cepas capazes de causar as maiores mortalidades (45% a 59%) nas operárias foram selecionadas para condução do postulado de Koch com o objetivo de verificar se o *B. thuringiensis* era o agente causal da mortalidade. O isolamento das bactérias dos insetos mortos ocorreu no primeiro bioensaio e por meio de análise em microscópio de luz foi confirmada a presença das bactérias *B. thuringiensis*, havendo a formação do complexo esporo/cristal. Insetos sadios foram alimentados com dietas contaminadas com estes isolados e sofreram mortalidade similar ao primeiro bioensaio, constatando que o agente causal da mortalidade era a bactéria *B. thuringiensis*. Um bioensaio com concentrações variadas (1×10^6 a 1×10^{10} esporos/mL⁻¹) da cepa mais eficiente na indução da mortalidade (T24) demonstrou que não houve diferença estatística, embora a concentração de 1×10^8 esporos/mL induziu uma mortalidade cerca de 10% maior que as demais concentrações. Análises de microscopia eletrônica de varredura revelaram que os cristais das cepas medem, aproximadamente, 2,0 μ m longitudinalmente e que, provavelmente, o tamanho destes cristais podem ter relação com a patogenicidade da bactéria. Com estes resultados de mortalidade é possível sugerir que *B. thuringiensis* pode ser empregado como método de controle promissor de *A. sexdens*. Mais estudos serão conduzidos visando à caracterização molecular dos potenciais genes tóxicos para esta espécie.

Palavras-chave: Formigas cortadeiras. Proteínas Cry. Bt. Microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is an entomopathogenic bacterium that produces proteins that are toxic against various insect orders. In order to identify the pathogenicity of *B. thuringiensis* against leaf-cutting ants *Atta sexdens*, eight strains were tested in mortality bioassays in feeding. The five strains capable of causing the highest mortality (45% to 59%) in workers were selected to conduct Koch's postulate with the aim of verifying whether *B. thuringiensis* was the causative agent of mortality. The isolation of the bacteria from the dead insects occurred in the first bioassay and through analysis under a light microscope, the presence of the bacteria *B. thuringiensis* was confirmed, with the formation of the spore/crystal complex. Healthy insects were fed diets contaminated with these isolates and suffered mortality similar to the first bioassay, confirming that the causal agent of mortality was the bacterium *B. thuringiensis*. A bioassay with varying concentrations (1×10^6 to 1×10^{10} spores / mL⁻¹) of the strain most efficient in inducing mortality (T24) demonstrated that there was no statistical difference, although the concentration of 1×10^8 spores / mL induced mortality about 10% higher than the other concentrations. Scanning electron microscopy analyzes revealed that the strains' crystals measure approximately 2.0 μm longitudinally and that the size of these crystals may be related to the bacterial pathogenicity. With these mortality results it is possible to suggest that *B. thuringiensis* can be used as a promising control method for *A. sexdens*. Further studies will be conducted aiming at the molecular characterization of potential toxic genes for this species.

Keywords: Leaf-cutting ants. Cry proteins. *Bt*. Scanning electron microscopy.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das maiores áreas de florestas plantadas no mundo, com aproximadamente 7,83 milhões de hectares, sendo considerado um dos maiores produtores mundiais de papel celulose. Dentre as espécies arbóreas com maior área plantada destacam-se o eucalipto, com cerca de 5,7 milhões de hectares, e o pinus, com cerca de 1,6 milhões de hectares plantados (IBÁ, 2019).

Estas florestas sofrem com o ataque de formigas cortadeiras, que são consideradas uma das principais pragas florestais. Elas são capazes de acometer as florestas em todas as épocas do ano. Causando como perdas diretas e indiretas, como a diminuição do tamanho das árvores e a redução da resistência a outros insetos e alguns patógenos, além de cortes em brotos, folhas, flores e galhos (MATRANGOLO *et al.*, 2014).

O método mais comumente utilizado para o seu controle é o químico, feito através do uso de inseticidas termonebulizáveis e iscas tóxicas (ZANETTI *et al.*, 2014). O uso de iscas a base de sulfluramida e fipronil é considerado o método mais eficiente, econômico e prático de controle das formigas cortadeiras (MAPA, 2013b; TEIXEIRA; SANTOS, 2008). Entretanto, estes químicos podem trazer alguns problemas, tais como seu potencial de bioacumulação no solo e em lençóis freáticos além de sua toxicidade à organismos não alvo, devido ao seu amplo espectro de ação (BEDOR *et al.*, 2009).

O controle biológico com *Bacillus thuringiensis* tem sido considerado um método promissor e surgiu como uma alternativa ao uso de produtos químicos, devido a sua alta eficiência e baixo risco de contaminação no meio ambiente (LIMA *et al.*, 2012). Outro fator levado em consideração é devido ao seu alto grau de especificidade, além de ser conhecido como um bioinseticida de ação rápida, onde que seus efeitos adversos em organismos não alvo são bastante limitados (JAIN; SAHARAN; PAREEK, 2016; LACEY *et al.*, 2015).

O *B. thuringiensis* é uma bactéria entomopatogênica que possui a capacidade de produzir proteínas inseticidas que são capazes de colonizar uma vasta gama de hospedeiros, estas proteínas podem ser as Crystal (Cry), Vegetativas (Vip), Cytolíticas (Cyt), e a Thuringiensina (β -exotoxina) (BRAVO; GILL; SOBERON, 2007). As proteínas Cry são as mais estudadas atualmente e seu modo de ação consiste, basicamente, na lise das células epiteliais do intestino médio dos hospedeiros. Em pH altamente alcalino ocorre uma solubilização das proteínas e, o fragmento tóxico se liga em receptores específicos, formando poros nas microvilosidades do intestino médio dos insetos, desta forma ocorre um

desiquilíbrio osmótico e o inseto é levado à morte, por septicemia ou inanição (BRAVO *et al.*, 2002).

Apesar do amplo espectro de ação de *B. thuringiensis* contra diversas ordens de insetos, a sua efetividade no controle de formigas cortadeiras ainda é pouco conhecida. Não obstante sabe-se que as proteínas *cry3A*, *cry5A*, *cry22A* e *cry9* possuem um espectro de ação contra insetos da ordem Hymenoptera (FRANKENHUYZEN, 2009; PINTO *et al.*, 2003). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi fornecer suspensões esporuladas de diferentes cepas de *B. thuringiensis* em dietas artificiais para operárias forrageadoras de *Atta sexdens* (Hymenoptera: formicidae), buscando identificar o nível de patogenicidade causado, e associar a patogenicidade com a concentração de esporos e a presença de cristais proteicos nas amostras.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local dos experimentos

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas e no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Com as cepas públicas de *B. thuringiensis* cedidas pelo Laboratório de Controle Biológico (LCB) da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas MG. Estas são provenientes do Instituto Pasteur / França.

2.2 Coleta, criação e manutenção da colônia de *Atta sexdens*

Para o estabelecimento das colônias, rainhas de *A. sexdens* foram coletadas no período de revoada no campus da UFLA em 2014, e o cultivo da colônia *in vitro* ocorreu em condições controladas de baixa ou nenhuma luminosidade, umidade relativa do ar em 70% e temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. A limpeza das colônias é feita semanalmente e as formigas foram alimentadas diariamente com espécies vegetais.

2.3 Isolados de *Bacillus thuringiensis*

Oito cepas de *B. thuringiensis* foram utilizadas nos bioensaios com as operárias forrageadoras. As cepas estão denominadas como T6 *Bt. entomocidus*, T7 *Bt. aizawai*, T10 *Bt. darmstadiensis*, T16 *Bt. indiana*, T23 *Bt. japonensis*, T24 *Bt. neoleonensis*, T27 *Bt.*

mexicanensis e T29 *Bt. amagiensis*. Estas cepas foram crescidas em meio Lúria-Bertani (LB) sólido acrescido de sais (0,3 g/L MgSO₄, 0,02 g/L FeSO₄, 0,02 g/L ZnSO₄ e 0,02 g/L MnSO₄) (VALICENTE; MOURÃO, 2008) a um pH de 7,5 e mantidas por 24 horas em temperatura de 30°C. Posteriormente, as cepas foram isoladas novamente por um período de 72 horas a uma temperatura de 30°C com o objetivo de se retirar colônias isoladas de cada cepa e garantir a ocorrência do processo de esporulação e liberação dos cristais.

Após o período de crescimento, a massa bacteriana foi raspada com o auxílio de lâminas para microscopia e diluída em 10 mL de água destilada e autoclavada para a posterior realização dos bioensaios. A contagem de esporos para avaliar a concentração de cada cepa foi feita a partir de três diluições seriadas, por meio do uso de câmara de Neubauer e microscópio de contraste de fases em aumento de 40X (HORTA, 2012). A concentração final de cada cepa foi de aproximadamente 10⁸ esporos/mL. Ao final, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C até a condução dos bioensaios de mortalidade.

2.4 Fornecimento de cepas públicas de *Bacillus thuringiensis* via dieta artificial para forrageadoras de *Atta sexdens*

A metodologia de montagem do bioensaio para o fornecimento das dietas contendo *B. thuringiensis* foi de acordo com Bueno *et al.* (1997). Para a alimentação das formigas foi ofertada uma dieta semi-sólida composta por 50 g de glicose, 10 g de extrato de levedura, 10 g de peptona bacteriológica, 15 g de ágar para cada 1,0 L de H₂O destilada. O experimento foi conduzido em placas de petri de vidro, forradas com papel filtro, contendo um pedaço de 1,0 cm³ da dieta sobre papel alumínio. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos (dietas com cepas de *B. thuringiensis*) e um controle (dietas com H₂O destilada e autoclavada). Cada tratamento foi composto por seis repetições com 20 formigas cada.

Nos três primeiros dias de experimento, as dietas foram molhadas com 50 µL das suspensões de *B. thuringiensis* na concentração de 10⁸ esporos/mL, e o controle negativo com 50 µL de H₂O. Após este período, as formigas receberam apenas a dieta sem a solução de *B. thuringiensis* e sem água no tratamento controle por mais 12 dias. O bioensaio foi conduzido por um período total de 15 dias, com troca diária da dieta e do papel filtro com o objetivo de se eliminar possíveis contaminações. As placas com as formigas foram mantidas em BOD com temperatura de 23 ± 2°C e umidade relativa de 70% ± 10. A contagem do número de formigas vivas ocorreu a cada 24h e as formigas mortas foram retiradas da placa.

2.5 Postulado de Koch

O Postulado de Koch foi conduzido com o objetivo de confirmar que o agente causal da mortalidade das forrageadoras é o *B. thuringiensis*. Os insetos mortos no primeiro bioensaio foram coletados e armazenados a -20°C . Apenas as cepas que induziram maior mortalidade foram utilizadas. Os insetos mortos no tratamento com H_2O (controle) também foram coletados como controle (Controle Iso).

Os insetos coletados foram lavados em solução de hipoclorito 1% e álcool 70% para eliminar possíveis contaminações exógenas. Após o procedimento de lavagem, grupos de 20 insetos de cada tratamento foram macerados em 5,0 mL de solução salina 0,8%, e depois mantidos sob agitação a 200 rpm durante 16 horas a 30°C . Após a agitação as amostras foram decantadas por 30 minutos, a suspensão transferida para microtubos de 1,5 mL e colocadas em banho maria a 65°C durante 30 minutos, seguido de 5 minutos no gelo (VALICENTE; BARRETO, 2003).

Em seguida, 50 μL da suspensão bacteriana foram espalhados em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido acrescido de sais (MnSO_4 , ZnSO_4 , FeSO_4) a um pH de 7,5. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas. Após a incubação, cinco colônias que apresentaram características de *B. thuringiensis* foram selecionadas e plaqueadas individualmente em meio LB sólido distribuído em gotas em placas de Petri. As placas foram incubadas a 30°C por 72 horas. Os isolados foram analisados em microscópio de contraste de fase em aumento de 40X e aquelas colônias que apresentaram cristais foram selecionadas e crescidas novamente em meio LB sólido por mais 72 horas a 30°C . Após o crescimento, as massas bacterianas foram raspadas e adicionadas em 1,0 mL de água destilada previamente autoclavada e armazenados a -20°C até uso.

Em seguida, 10 μl desta suspensão foram incubados em placas de Petri contendo o mesmo meio LB. Foram inoculadas duas placas por cepa. Estas foram crescidas por 72 horas a 30°C , e a massa bacteriana foi raspada e diluída em 20 mL de água previamente destilada e autoclavada. A contagem de esporos para a verificação da concentração de cada cepa ocorreu conforme descrito no primeiro bioensaio, até atingir a concentração de 10^8 esporos/mL.

Os bioensaios para avaliar a mortalidade das formigas causadas pelas cepas isoladas de insetos mortos foram realizados conforme a metodologia abordada no item 2.4.

2.6 Teste de mortalidade com diferentes concentrações de esporos de *Bacillus thuringiensis*

Para realizar o teste com diferentes concentrações de esporos foi selecionada a cepa com maior taxa de indução de mortalidade nas forrageadoras (cepa T24 *Bt. neoleonensis*). As concentrações determinadas foram de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} esporos/mL. Para aumentar a concentração destas cepas em suspensão, foi utilizado o dobro de massa bacteriana para realizar a suspensão em 10 mL de água destilada.

A cepa T24 foi crescida em meio LB sólido acrescido de sais (0,3 g/L $MgSO_4$, 0,02 g/L $FeSO_4$, 0,02 g/L $ZnSO_4$ e 0,02 g/L $MnSO_4$) a um pH de 7,5 durante 24 horas a 30°C e após este período foram retiradas colônias isoladas e crescidas por mais 72 horas em meio LB a 30°C. Para cada 10 mL de água previamente destilada e autoclavada, foi adicionada a massa bacteriana de duas placas de Petri contendo *B. thuringiensis*. Para a verificação da concentração de esporos, as suspensões bacterianas passaram por três diluições seriadas, sendo possível verificar que a concentração da suspensão estoque que deu origem as demais estava na concentração de 10^{10} esporos/mL. Desta forma, a obtenção das concentrações de 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 esporos/mL ocorreu através de diluições da suspensão estoque.

O experimento foi conduzido por 15 dias, onde as formigas foram alimentadas com as suspensões de diferentes concentrações por um período de três dias, e após este período foi oferecida apenas a dieta sem a suspensão bacteriana. O experimento foi avaliado diariamente, contando o número de formigas vivas em cada placa e retirando as formigas mortas, semelhante ao item 2.4.

2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada com o objetivo de se analisar o formato e tamanho dos cristais presentes nas cepas que promoveram maior média de mortalidade das forrageadoras (T24 *Bt. neoleonensis*, T06 *Bt. entomocidus*, T16 *Bt. indiana*, T10 *Bt. darmstadiensis*, T27 *Bt. mexicanensis*) além da cepa T29 *Bt. amagiensis* que apresentou menor mortalidade, com o objetivo de averiguar qual era o formato de seus cristais, e se estes exibiam alguma diferença quando comparados com as cepas de maior média de mortalidade.

O meio para o cultivo do *B. thuringiensis* foi o LB acrescido de sais, entretanto foi adicionado o dobro de ágar do recomendado (30 gramas de ágar por litro). Estas colônias

foram crescidas a 30°C por quatro dias, e após este período foram mantidas em geladeira por 30 dias, desta forma o meio estaria mais consistente e um pouco desidratado, facilitando no processo de preparo da MEV. O meio contendo a massa bacteriana foi cortado em pequenos discos para o posterior processo de preparo das amostras (VALICENTE SOUZA, 2004).

O preparo das amostras para a microscopia envolveu basicamente os processos de fixação, contrastação, desidratação, ponto crítico foi realizado em equipamento EMITECH K850 e a metalização foi o processo no qual as amostras passaram por um banho de ouro. Após o procedimento de preparo das amostras, estas passaram por análise em microscópio eletrônico de varredura, sendo possível analisar o tamanho e formato dos cristais presentes em cada cepa.

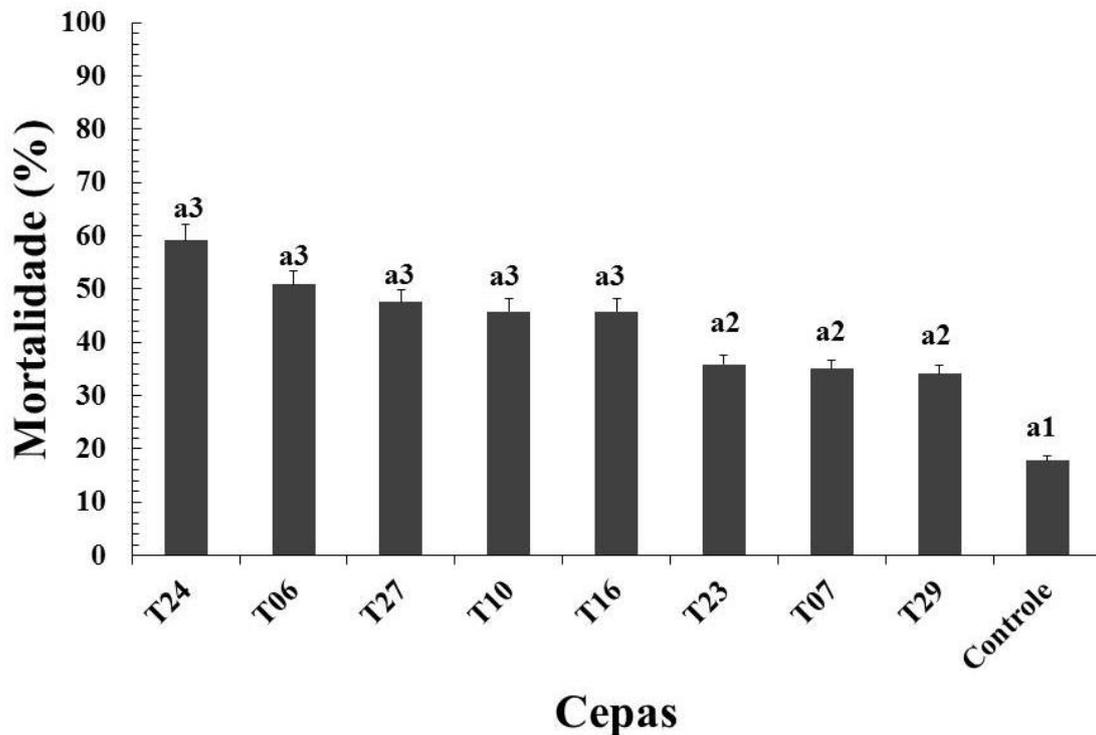
2.8 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas referentes aos bioensaios de mortalidade foram feitos os testes de média ANOVA (Skott-Knott) realizados no software Sisvar (FERREIRA, DANIEL FURTADO, 2014) e a análise de sobrevivência de Weibull realizada no software R (TERRY M. THERNEAU, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença significativa na mortalidade de formigas entre as oito cepas de *B. thuringiensis* (ANOVA; $p < 0,05$). As cepas T24, T06, T27, T10 e T16 não se diferenciavam estatisticamente, sendo que este grupo apresentou uma maior média de mortalidade 59,1%, 50,8%, 47,5%, 45,8% e 45,8% respectivamente. As cepas T23, T07 e T29 apresentaram médias de mortalidade de 35,8%, 35% e 34,2% respectivamente, enquanto o tratamento controle exibiu uma média de mortalidade de 17,2% (Gráfico1).

Gráfico 1 – Mortalidade de formigas forrageadoras *Atta sexdens* alimentadas com dieta artificial contendo suspensões de oito cepas públicas de *Bacillus thuringiensis* e um controle negativo contendo H₂O.



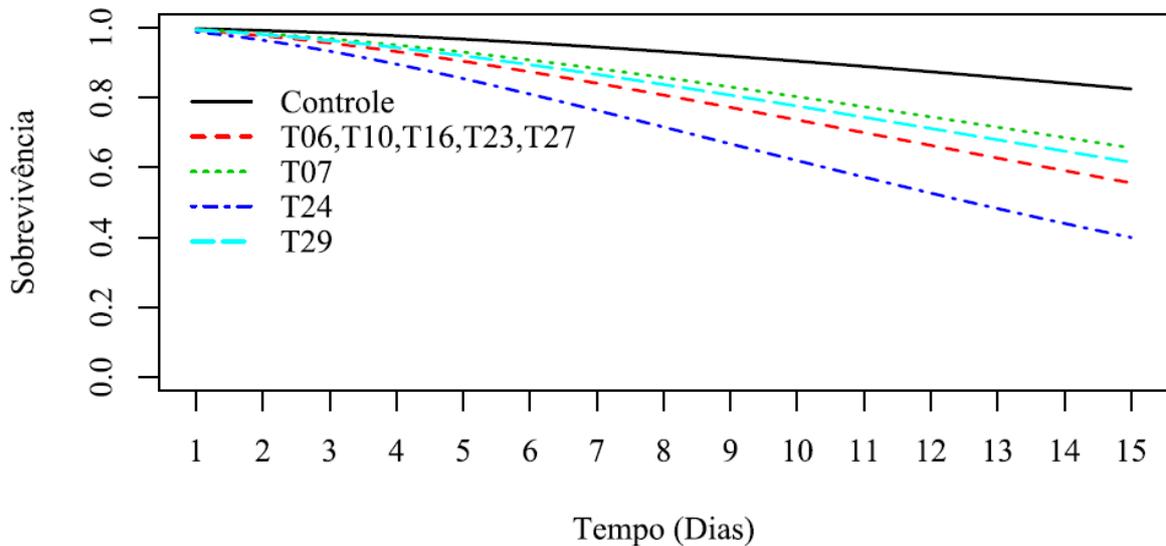
Legenda: Médias seguidas pela mesma letra e número nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora, 2019.

Embora através do teste de médias os resultados das cepas T24, T06, T27, T10 e T16 serem iguais estatisticamente, a análise de sobrevivência de Weibull mostrou que a cepa T24 produziu maior mortalidade em operárias forrageadoras de *A. sexdens* ao decorrer dos 15 dias de avaliação, sendo que ao final da avaliação foi o tratamento que exibiu um menor número de indivíduos vivos (Gráfico 2).

Durante os 15 dias de avaliação as cepas T06, T10, T16, T23 e T27 também induziram a uma diminuição no número de formigas vivas sendo iguais estatisticamente em função do tempo. As cepas T07 e T29 não seguiram nos testes subsequentes porque foram menos eficientes dentre as cepas analisadas. Contudo, estes primeiros resultados evidenciaram um potencial uso de *B. thuringiensis* para o controle de *A. sexdens*.

Gráfico 2 – Curva de sobrevivência de Weibull de forrageadoras *Atta sexdens* alimentadas com *Bacillus thuringiensis*.



Legenda: Curva de sobrevivência de Weibull de forrageadoras *Atta sexdens* alimentadas com suspensões de oito cepas públicas de *B. thuringiensis* durante um período de 15 dias (T24, T06, T27, T16, T10, T23, T07 e T29) e um controle contendo H₂O. Teste significativo a 1% (Weibull; $p < 0,01$).
Fonte: Da autora, 2019.

Outros trabalhos também avaliaram a toxicidade de *B. thuringiensis* contra himenopteros. Três cepas foram testadas contra *Monomorium pharaonis* (Hymenoptera: Formicidae), também conhecidas como formigas-faraó, durante 21 dias, e estas induziram mortalidade de cerca de 85% em formigas operárias, sendo estas as cepas PS86Q3, PS14E2 e PS211B2 (PAYNE *et al.*, 1997). A atividade de *B. thuringiensis* também foi estudada para o controle de *Diprion pini* (Hymenoptera: Diprionidae), que ataca principalmente culturas de pinus em toda a Europa. A cepa estudada PS86Q3 causou cerca de 35% de mortalidade em larvas deste himenoptero-praga (GARCIA-ROBLES *et al.*, 2001).

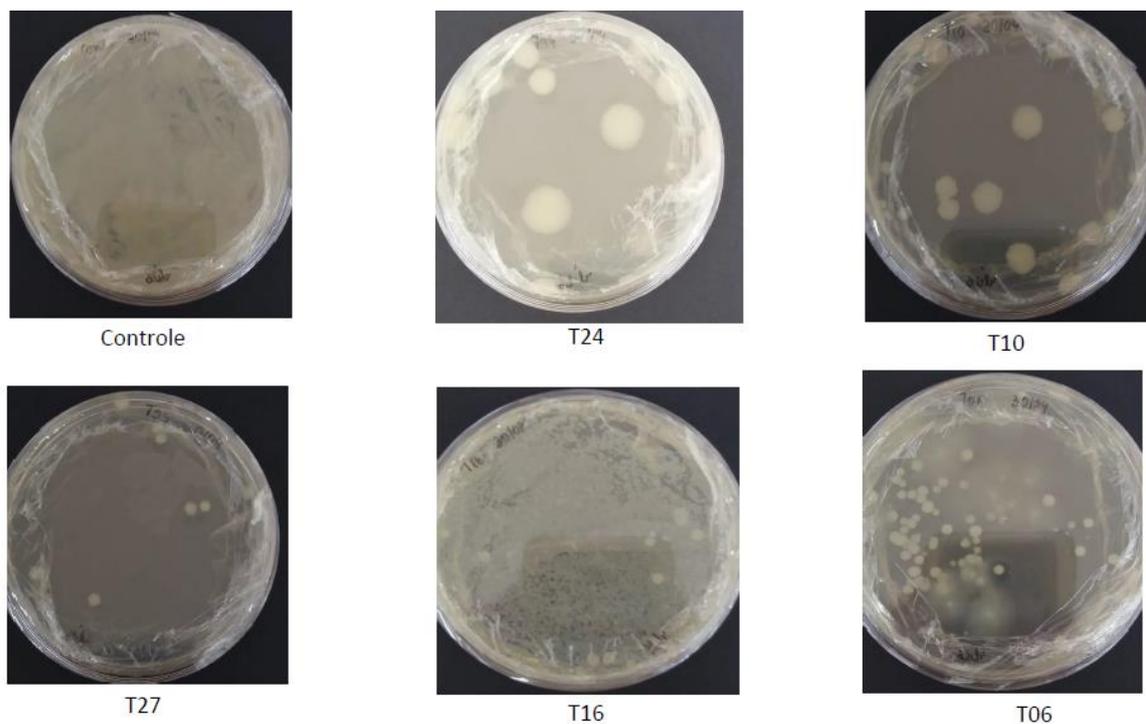
Em estudos visando analisar a patogenicidade de *B. thuringiensis* isolados a partir de duas espécies formigas do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: formicidae), três cepas induziram médias de mortalidade entre 50% e 100% contra *Acromyrmex crassipinus* e *Acromyrmex lundii* (PINTO, *et al.*, 2003). A patogenicidade de *B. thuringiensis* contra himenopteros é pouco abordada, entretanto, na busca por métodos de controle alternativos para a formiga de fogo *Solenopsis invicta* foi encontrada uma cepa de *B. thuringiensis* capaz de controlar esta espécie, onde foi identificada a presença do gene *cry3A* (BULLA JR; CANDAS, 2004). A patogenicidade de *B. thuringiensis* também foi verificada para o controle de *Diprion similis* (Hymenoptera: Diprionidae), mais conhecida como mosca do pinheiro. A

cepa testada foi a PS201T6 e através de bioensaios *in vitro* foi capaz de causar até 50,7% de mortalidade em larvas desta mosca (VAN FRANKENHUYZEN; TONON, 2013).

O estudo mais recente encontrado em relação à patogenicidade de *B. thuringiensis* contra himenopteros analisou a eficiência de diferentes extratos bacterianos para o controle de operárias de *Atta cephalotes*, entre estes extratos a atividade de *B. thuringiensis* foi avaliada via bioensaios de mortalidade, e foi possível constatar uma atividade formicida em cerca de 72 horas (REYES, 2019).

As bactérias extraídas das formigas mortas alimentadas com as cepas de *B. thuringiensis* apresentaram crescimento diferenciado de tamanho entre as colônias bacterianas crescidas (Figura 1).

Figura 1 – Fotografia do crescimento de colônias isoladas de operárias de *Atta sexdens* mortas coletadas no primeiro bioensaio com *Bacillus thuringiensis*.



Legenda: Crescimento de bactérias isoladas de formigas mortas alimentadas com *B. thuringiensis*. Isolamento realizado com solução salina 0,8% e posterior choque térmico. Todas as colônias apresentaram crescimento diferenciado, porém as colônias T24, T10, T27, T16 e T06 destacaram características de *B. thuringiensis*, como colônias em forma circular, aparência leitosa e bordas onduladas .

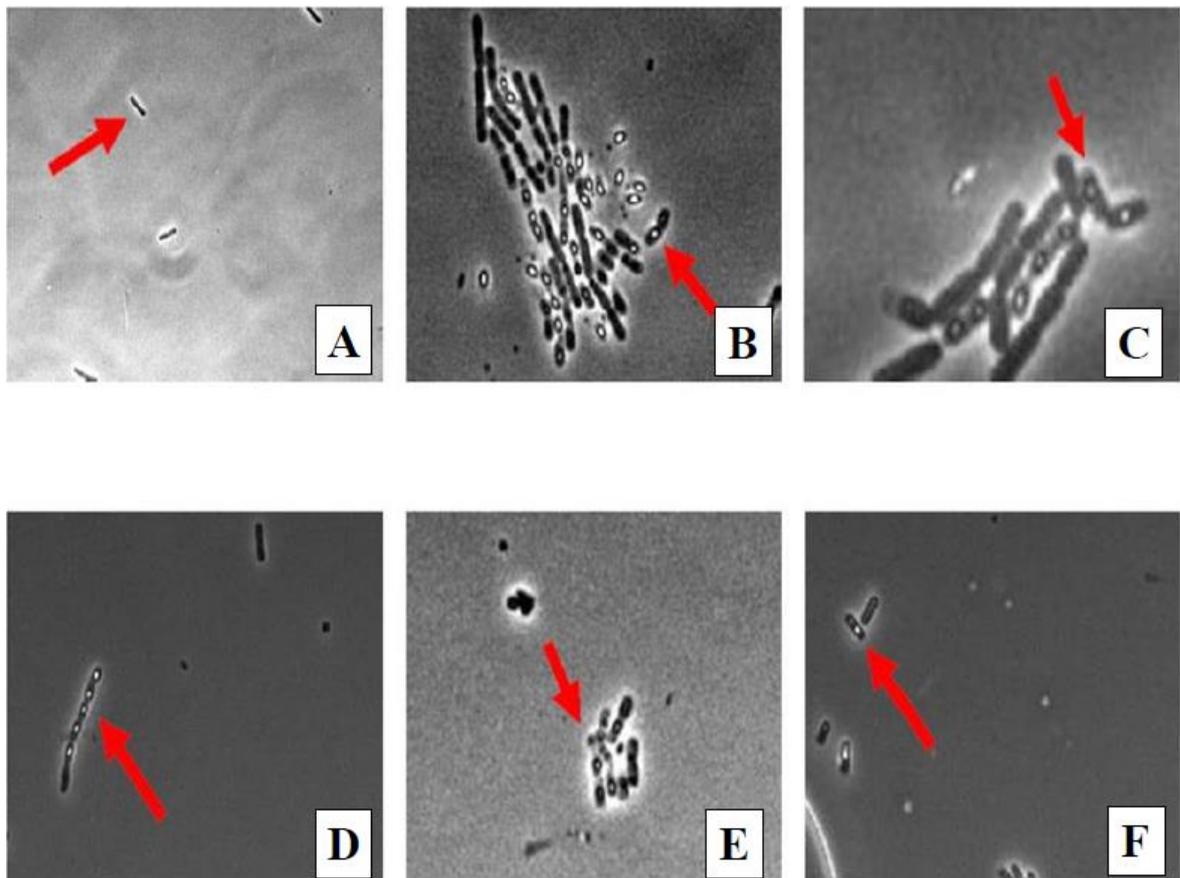
Fonte: Da autora, 2019.

As colônias de *B. thuringiensis* apresentam características morfológicas típicas, como coloração opaca, sem pigmentação e com estrutura densa. As colônias exibem bordas onduladas, forma circular e aparência leitosa (SOSA-GÓMEZ; TIGANO; ARANTES, 1998).

Na microscopia de contraste de fases foi possível confirmar que os isolados pertencentes as cepas T16, T10, T27, T06 e T24 de *B. thuringiensis* extraídos de insetos mortos alimentados, exibiram a presença de esporos e cristais, enquanto que nas amostras extraídas de insetos alimentados apenas com água ocorreu o crescimento de uma bactéria não identificada em formato de bastonete, sem a formação do complexo esporo/cristal (Figura 2).

Desta forma, após o crescimento bacteriano das amostras extraídas de insetos mortos alimentados com *B. thuringiensis* e através das características morfológicas observadas, foi possível inferir que as colônias presentes nas amostras são colônias típicas de *B. thuringiensis*.

Figura 2 – Microscopia óptica (40X) de bactérias extraídas de formigas *Atta sexdens* mortas alimentados com *Bacillus thuringiensis*.

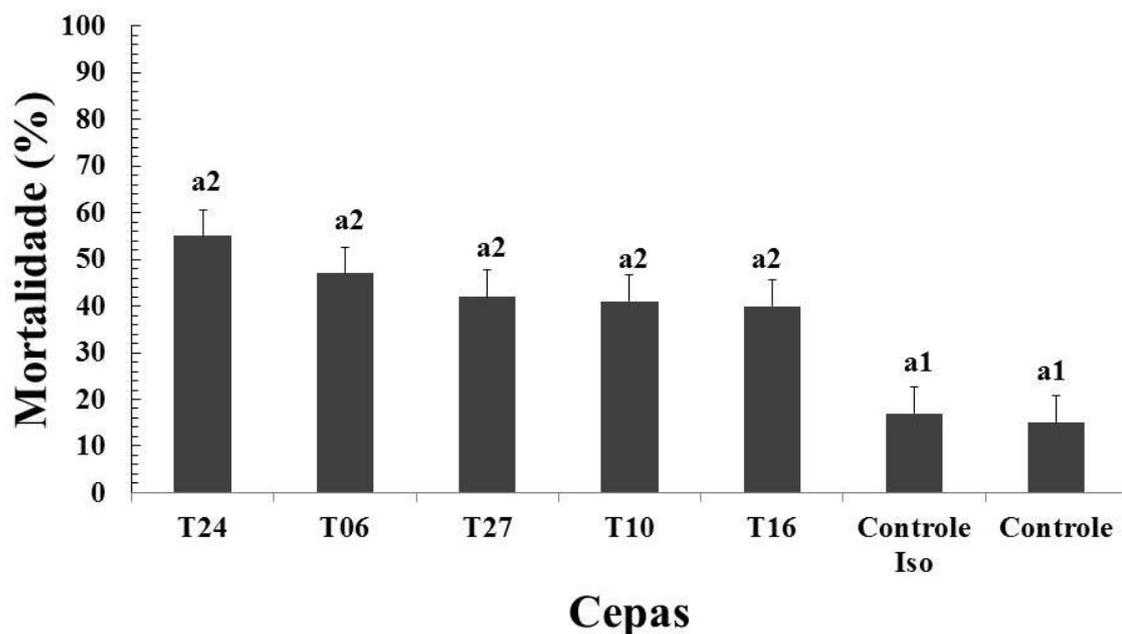


Legenda: Tratamento controle, seta indicando bactéria sem formação de complexo esporo/cristal (A), cepa T06 de *B. thuringiensis* (B), cepa T10 de *B. thuringiensis* (C), cepa T16 de *B. thuringiensis* (D), cepa T24 de *B. thuringiensis* (E), cepa T27 de *B. thuringiensis* (F). Setas nas figuras B, C, D, E e F indicam a formação de complexo esporo/cristal.

Fonte: Da autora, 2019.

Os resultados de mortalidade com os isolados provenientes dos insetos mortos alimentados com as cepas de *B. thuringiensis* foram similares aos resultados do primeiro bioensaio. As mortalidades causadas pelas cepas T24, T06, T27, T10 e T16 não se diferenciaram significativamente entre si chegando em taxas de mortalidade de 55%, 47%, 42%, 41% e 40%, respectivamente. No tratamento Controle Iso, proveniente da bactéria não identificada extraída de formigas alimentadas com água, a taxa de mortalidade foi de 17%, estatisticamente igual ao tratamento controle que causou a 15% de mortalidade das formigas forrageadoras (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Mortalidade de formigas forrageadoras *Atta sexdens* alimentadas com *Bacillus thuringiensis* isolados de formigas mortas (T24, T06, T27, T16 e T10) e um controle contendo H₂O.



Legenda: Médias seguidas pela mesma letra e número nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora, 2019.

A realização do postulado de Koch em insetos infectados com *B. thuringiensis* é eficiente para verificação do agente causal da mortalidade em diferentes ordens de insetos, incluindo os Hymenopteros. Resultados semelhantes foram obtidos após o isolamento de *B. thuringiensis* em *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), onde os bioensaios exibiram resultados semelhantes entre as cepas originais e os isolados de insetos mortos (TORRES-QUINTERO *et al.*, 2015). Cabe ressaltar que, em nosso trabalho as taxas de mortalidade

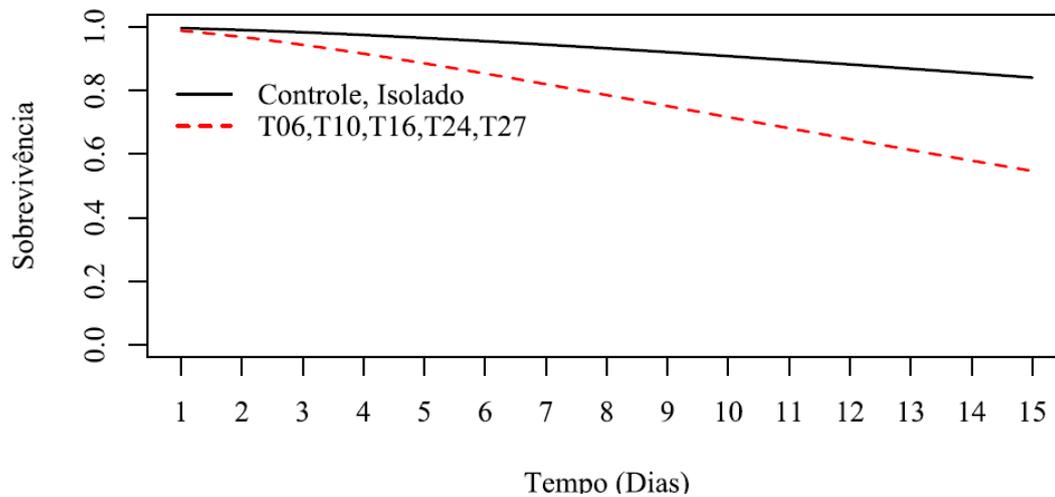
obtidas após a realização do postulado de Koch foram similares às observadas no primeiro bioensaio realizado com as oito cepas de *B. thuringiensis*. O fato das taxas de mortalidade serem próximas reforça a probabilidade de que o *B. thuringiensis* realmente é o agente causal da mortalidade nas forrageadoras de *A. sexdens*.

As cinco cepas que induziram maiores taxas de mortalidade no presente trabalho também foram estudadas por Valicente e Fonseca (2010), que tiveram como objetivo principal testar cepas de *B. thuringiensis* contra a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Porém, as taxas de mortalidade das cepas T24, T06, T27 e T16 não foram satisfatórias contra este lepidóptero-praga, pois as taxas de mortalidade foram baixas (entre 9,8% e 17,9%). A única cepa em comum que causou uma taxa de mortalidade satisfatória também para *S. frugiperda* foi a cepa T10, que causou a uma de mortalidade de 77,09% de neonatas de *S. frugiperda*. Esta diferença apresentada nas mortalidades causadas pelas cepas estudadas contra as forrageadoras de *A. sexdens* e as mortalidades contra *S. frugiperda* pode ser devido ao espectro de ação de *B. thuringiensis*, pois esta bactéria possui proteínas inseticidas que são altamente específicas (ARONSON; BECKMAN; DUNN, 1986; WHITELEY; SCHNEPF, 1986).

Operárias de *A. sexdens* alimentadas com o *B. thuringiensis* extraído das formigas mortas demonstraram um menor número de formigas vivas quando comparadas com os tratamentos Controle e Controle Iso (Gráfico 4). Embora os tratamentos com as cepas T24, T06, T27, T10 e T16 não apresentarem diferença estatística entre si, o padrão e as médias de mortalidade foram similares ao primeiro bioensaio realizado com as oito cepas iniciais.

Através dos resultados obtidos no postulado de Koch, é possível considerar que as cinco cepas selecionadas tem potencial para serem empregadas no controle de forrageadoras de *A. sexdens*, porém novos estudos de caracterização molecular devem ser realizados para analisar se tais cepas apresentam apenas um ou um conjunto de genes que codificam proteínas responsáveis pela patogenicidade de dessas cepas.

Gráfico 4 – Curva de sobrevivência de Weibull de forrageadoras *Atta sexdens* alimentadas com *Bacillus thuringiensis* extraído de formigas mortas.

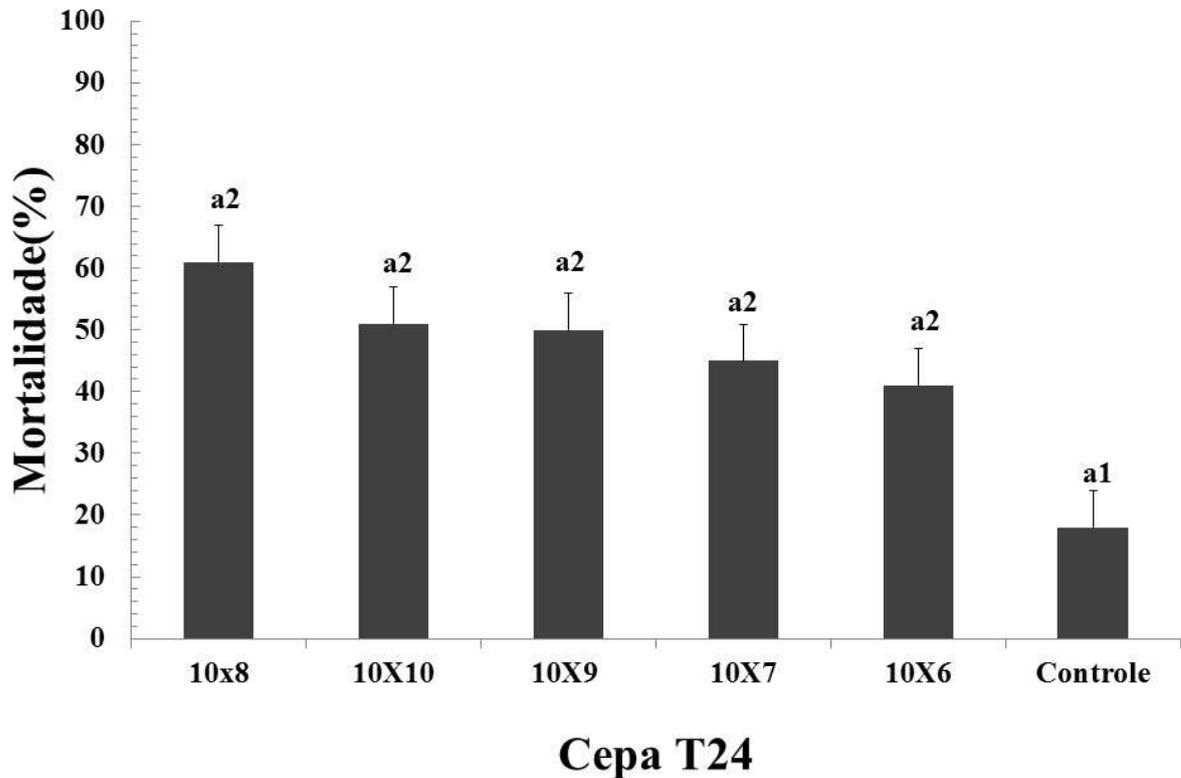


Legenda: Curva de sobrevivência de Weibull significativa a 1% ($p < 0,01\%$). As formigas forrageadoras *A. sexdens* foram alimentadas com cepas de *B. thuringiensis* isoladas de formigas mortas alimentadas com as cepas (T24, T06, T27, T16 e T10), um controle contendo H_2O e um Controle Isso contendo a bactéria extraída não identificada.

Fonte: Da autora, 2019.

Para que sejam realizados testes de patogenicidade com formulações de *B. thuringiensis* é necessário que a concentração de esporos das formulações seja expressa em valores de unidades biológicas com base na comparação com um padrão (BONNEFOI, 1958; BURGERJON, 1959). Dentre as cinco concentrações de *B. thuringiensis* testadas neste trabalho, todas foram estatisticamente iguais, ou seja, não houve diferença quanto à mortalidade das formigas, exceto no tratamento controle que induziu a uma mortalidade de 18%. As médias de mortalidade de *A. sexdens* alimentadas com diferentes concentrações da cepa T24 de *B. thuringiensis* foram de 1×10^8 esporos/mL foi de cerca de 61%, seguida por 51% de 1×10^{10} esporos/mL, 50% de 1×10^9 esporos/mL, 45% de 1×10^7 esporos/mL e 41% de 1×10^6 esporos/mL (Gráfico 5). As formigas alimentadas com o *B. thuringiensis* a uma concentração de 10^8 esporos/mL apresentaram uma taxa de mortalidade cerca de 10% maior que a concentração de 10^{10} esporos/mL.

Gráfico 5 – Médias de mortalidade de formigas forrageadoras *Atta sexdens* alimentadas com a cepa T24 de *Bacillus thuringiensis* em diferentes concentrações (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} esporos/mL) e um controle contendo H_2O .



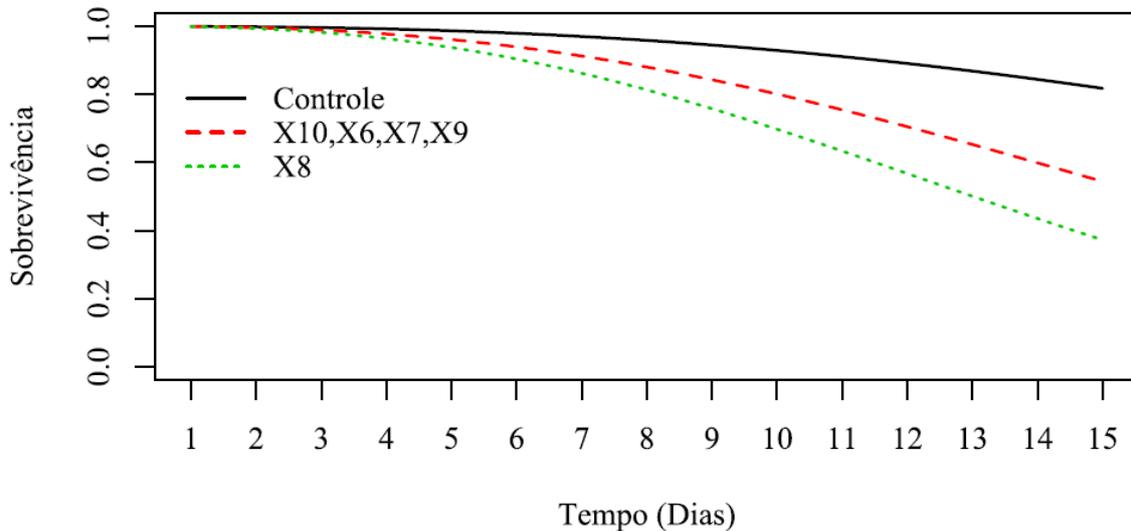
Legenda: Médias seguidas pela mesma letra e número nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora, 2019.

Outros bioensaios de mortalidade com *B. thuringiensis* utilizam a concentração de 10^8 esporos/mL como um padrão de concentração das cepas em testes de mortalidade. Testes de patogenicidade de *B. thuringiensis* contra *S. frugiperda* foram capazes de identificar 41 cepas que causaram 100% de mortalidade nesta praga, sendo que em todos os casos a concentração foi de 10^8 esporos/mL de cada cepa (FATORETTO *et al.*, 2007).

A curva de sobrevivência referente ao tratamento das formigas alimentadas com *B. thuringiensis* na concentração de 10^8 esporos/mL demonstrou que no decorrer dos 15 dias de avaliação esta concentração foi a que manteve o menor número de insetos vivos. Por volta do 6° e 7° dia de avaliação a curva de sobrevivência dos insetos alimentados com a concentração de 10^8 esporos/mL era menor do que as demais (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Curva de sobrevivência de Weibull com formigas forrageadoras *Atta sexdens* alimentadas com a cepa T24 de *Bacillus thuringiensis* em diferentes concentrações e um controle contendo H₂O.



Legenda: Curva de sobrevivência de Weibull significativa a 1% ($p < 0,01\%$). Formigas alimentadas com a cepa de T24 de *Bacillus thuringiensis* em concentrações de 1×10^6 a 1×10^{10} esporos por mL e um controle contendo H₂O.

Fonte: Da autora, 2019.

Apesar de todas as concentrações reduzirem a taxa de sobrevivência das formigas é possível verificar que a menor concentração de 10^6 esporos/mL foi a que manteve o maior número de insetos vivos ao final dos 15 dias de avaliação. Estes dados corroboram com a afirmação que a concentração de 10^8 esporos/mL é utilizada como uma concentração discriminatória na maioria dos testes de patogenicidade de *B. thuringiensis* (POLANCZYK; ALVES, 2005).

Uma hipótese levantada neste trabalho objetivando responder o questionamento da maior eficiência da concentração de 10^8 esporos/mL causar maior média de mortalidade quando comparada com as demais concentrações, pode ser devido ao fato de as formigas cortadeiras possuírem adaptações associadas a seu canal alimentar, que permitem a filtração de partículas ingeridas. Um exemplo destas adaptações é a cavidade infrabucal que é composta por uma espécie de filtro de pequenas cerdas, no qual a função destas cerdas é reter o material sólido ingerido durante a alimentação (DE JESUS; BUENO, 2007). Acredita-se que as concentrações de *B. thuringiensis* de 10^9 e 10^{10} esporos/mL não foram tão eficientes quanto 10^8 esporos/mL, pois os esporos poderiam estar agregados, e com isto retidos nas cerdas da cavidade infrabucal das operárias de *A. sexdens*. Operárias mínimas de *Acromyrmex octospinosus* possuem uma capacidade de filtração de partículas de até $10\mu\text{m}$ durante a

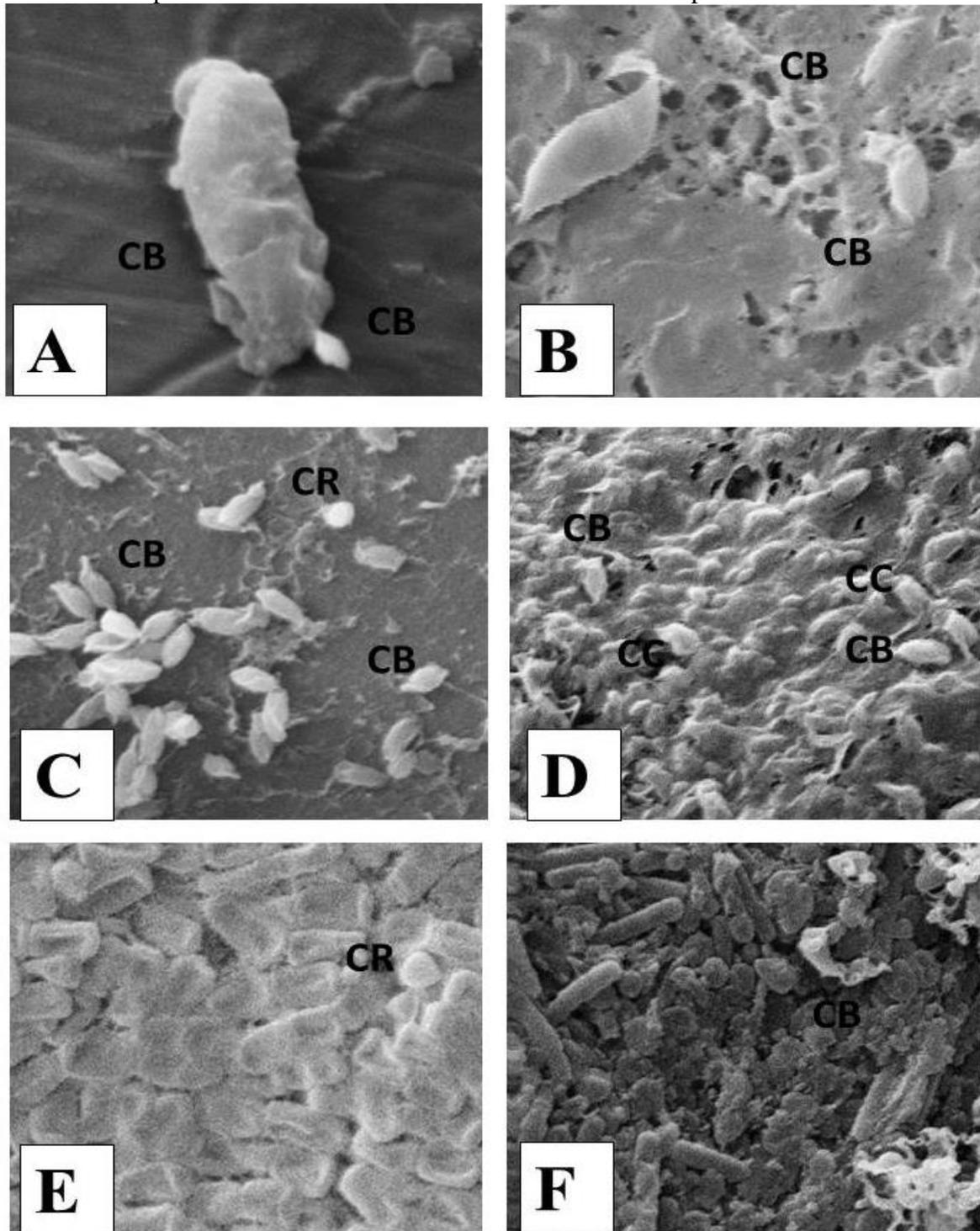
ingestão de alimentos líquidos, enquanto operárias de *Solenopsis invicta* podem filtrar partículas de cerca 1,8µm (GLANCEY *et al.*, 1981). Em operárias de *A. sexdens* as partículas retidas podem ser de até 2µm de diâmetro (BUENO, 2005).

Além da presença dos esporos, o *B. thuringiensis* apresenta a formação de cristais que possuem diferentes formatos e, ao serem ingeridos por insetos susceptíveis, sofrem a ação do pH intestinal e de proteases que solubilizam estes cristais e ativam as toxinas (BRAVO *et al.*, 2002). O *B. thuringiensis* possui um formato de bastonete e acredita-se que sua célula vegetativa possua um tamanho de aproximadamente 1,0 a 1,2 µm de largura por 3,0 a 5,0 µm de comprimento (HABIB; ANDRADE, 1998). Estes cristais podem ser bipiramidais, oblongos, cuboídes ou amorfos em muitas subespécies (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000).

Nas análises de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que a maioria dos cristais encontrados nas cepas em estudo era de formato bipiramidal e que os formatos observados longitudinalmente mediam cerca de 2,0 µm. A importância de se medir o formato dos cristais pode ser correlacionada à passagem de sólidos pela malha da cavidade infrabucal das operárias de *A. sexdens*.

Através da microscopia eletrônica de varredura foi identificada a presença de cristais bipiramidais na maioria das cepas. Entretanto, nas cepas T24 e T27 foi possível se identificar outros tipos de cristais. Na cepa T24, cristais bipiramidais e cuboídes e na cepa na cepa T27 cristais bipiramidais e redondos. Foi detectada a presença de cristais bipiramidais nas cepas T06, T10 e T29 e cristais redondos na cepa T16. Além disso, a cepa T16 foi a que apresentou o maior número de bastonetes na análise de microscopia (Figura 3).

Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura das cinco cepas de *B. thuringiensis* que apresentaram maior média de mortalidade contra operárias de *A. sexdens*.



Legenda: Aumento de 6.000x em escala longitudinal de 2 μ m. T10 (A), T06 (B), T27 (C), T24 (D), T16 (E), T29 (F). Cristal cuboide (CC), cristal redondo (CR) e cristal bipiramidal (CB).

Fonte: Da autora, 2019.

Ainda não se tem informações acerca do formato dos cristais tóxicos para a ordem dos hymenopteros. No entanto sabe-se que o formato dos cristais presentes nas cepas de *B. thuringiensis* podem estar associados à presença de proteínas inseticidas. Geralmente cepas

que apresentem cristais no formato redondo estão associadas à presença do gene *cry2*, podendo ser tóxico principalmente para lepidópteros e dípteros, e cepas com cristais na forma bipiramidal estão associadas ao gene *cry1*, geralmente tóxico para lepidópteros e coleópteros. Vale ressaltar que a presença dos cristais bipiramidais é mais abundante nas cepas do que as demais formas (LECUONA, 1996; PRAÇA *et al.*, 2004).

A microscopia eletrônica de varredura exibiu maioria dos cristais bipiramidais, e não foi capaz de fazer associações entre a mortalidade causada pelas cepas e o formato dos cristais. Contudo ao se realizar um mapeamento da presença de genes *cry* nas cepas em estudo é possível se ter maiores informações a cerca da patogenicidade destas contra *A. sexdens* além do que é necessário realizar uma expressão heteróloga das proteínas presentes nas cepas, com o objetivo de se analisar a mortalidade das proteínas isoladas. As cepas de *B. thuringiensis* tóxicas também devem ser testadas em diferentes castas de *A. sexdens* buscando um colapso total da colônia e um controle efetivo da praga

4 CONCLUSÃO

As cepas T24, T06, T29, T10 e T16 causaram maiores médias de mortalidade em *A. sexdens*. A cepa T24 foi a que apresentou um maior potencial de controle das formigas, levando cerca de 60% das operárias à morte. O Postulado de Koch confirmou que as cepas de *B. thuringiensis* realmente eram as responsáveis pela da mortalidade em *A. sexdens*, pois as médias de mortalidade se confirmaram e os resultados foram similares ao primeiro bioensaio.

A concentração de 10^8 esporos/mL foi a concentração que exibiu uma maior média de mortalidade. Este fator pode estar relacionado à filtração da malha da cavidade infrabucal de operárias de *A. sexdens*, que possui uma capacidade de filtração de partículas de até 2 μ m. A microscopia eletrônica de varredura forneceu informações acerca do tamanho dos cristais, no entanto, não foi possível obter correlações entre a taxa de mortalidade e o formato dos cristais.

REFERÊNCIAS

ARONSON, Arthur I; BECKMAN, W; DUNN, Peter. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiological reviews**, v. 50, n. 1, p. 1, 1986.

BEDOR, Cheila Nataly Galindo *et al.* Vulnerabilidades e situações de riscos relacionados ao uso de agrotóxicos na fruticultura irrigada. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 12, p. 39–49, 2009.

- BONNEFOI, A. Titration biologique des préparations de spores de *Bacillus thuringiensis*. **CR Acad. Sci.**, v. 247, p. 1418–1420, 1958.
- BRAVO, Alejandra *et al.* N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 23985–23987, 2002.
- BRAVO, Alejandra; GILL, Sarjeet S; SOBERON, Mario. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423–435, 2007.
- BUENO, O C. Alimentação em formigas: Subsídios para o controle. In: Simpósio de Mirmecologia. **Simpósio de Mirmecologia**, p. 39–42, 2005.
- BUENO, Odair C *et al.* Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, p. 107–113, 1997.
- BULLA JR, Lee A; CANDAS, Mehmet. Formicidae (ant) control using *Bacillus thuringiensis* toxin. **United States Patent and Trademark Office.** , 2004.
- BURGERJON, A. Titration et définition d'une unité biologique pour les préparations de *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Entomophaga**, v. 4, n. 3, p. 201–206, 1959.
- DE JESUS, C M; BUENO, O C. Mesa redonda Utilização de alimentos em diferentes espécies de formigas. **Biológico, São Paulo**, v. 69, n. suplemento 2, p. 107–110, 2007.
- FATORETTO, Júlio C *et al.* Associação de bioensaios e caracterização molecular para seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical entomology**, p. 737–745, 2007.
- FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109–112, 2014.
- FRANKENHUYZEN, Kees Van. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 1, p. 1–16, 2009.
- GARCIA-ROBLES, Inmaculada *et al.* Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 31, n. 9, p. 849–856, 2001.
- GLANCEY, B Michael *et al.* Filtration of microparticles from liquids ingested by the red imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren. **Insectes Sociaux**, v. 28, n. 4, p. 395–401, 1981.

- GLARE, Travis R; O'CALLAGHAN, Maurencoaut. *Bacillus thuringiensis* biology, ecology and safety, 2000.
- HABIB, M E M; ANDRADE, C F S. Bactérias entomopatogênicas. **Controle microbiano de insetos**, v. 2, p. 383–446, 1998.
- HORTA, André Ballerini. Seleção e caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782)(Lepdoptera: Geometridae). 2012.
- IBÁ. *Relatório 2019*. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- JAIN, Devendra; SAHARAN, Vinod; PAREEK, Sunil. Current Status of *Bacillus thuringiensis*: Insecticidal Crystal Proteins and Transgenic Crops. *Advances in Plant Breeding Strategies: Agronomic, Abiotic and Biotic Stress Traits*. **Springer**, 2016.
- LACEY, L A *et al.* Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 2015.
- LECUONA, Roberto Eduardo. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. **Roberto Eduardo Lecuona**, 1996.
- LIMA, Anna Carolina Carvalho *et al.* Diagnóstico sobre o uso do MIP nas principais áreas produtoras de melão dos Estados do Rio Grande do Norte e Ceará. **Revista Agro@ mbiente On-line**, v. 6, n. 2, p. 172–178, 2012.
- MAPA. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, 2013b.
- MATRANGOLO, Carlos Augusto Rodrigues *et al.* Crescimento de eucalipto sob efeito de desfolhamento artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 9, p. 952–957, 2014.
- PAYNE, Jewel M *et al.* *Bacillus thuringiensis* toxins active against hymenopteran pests. **Google Patents**, 1997
- PINTO, L M *et al.* Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae). **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 63, n. 2, p. 301–306, 2003.
- POLANCZYK, Ricardo Antonio; ALVES, Sérgio Batista. Biological parameters of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) assayed with *Bacillus thuringiensis* berliner. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 5, p. 464–468, 2005.
- PRAÇA, Lílian Botelho *et al.* Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 1, p.

11–16, 2004.

REYES, Adriana Ortiz. Bacterial extracts for the control of *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Agaricaceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 67, n. 4, 2019.

SOSA-GÓMEZ, D R; TIGANO, M S; ARANTES, O M N. Caracterização de entomopatógenos. **Controle microbiano de insetos**, ed. SB Alves, Piracicaba: Fealq, pp. 731–763, 1998.

TEIXEIRA, Maria Lucia França; SANTOS, Marcus Nascimento. Atratividade da isca granulada de polpa de fruto do jatobá para saúva-limão, no campo. **Ciência rural**, v. 38, n. 4, p. 907–911, 2008.

TERRY M. THERNEAU, Patricia M. Grambsch. Modeling Survival Data: **Extending the Cox Model R**. Disponível em: <url: <https://CRAN.R-project.org/package=surviva>>. , 2000.

TORRES-QUINTERO, Mary Carmen *et al.* Signs of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) infection in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae): Koch's postulates. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 2, p. 799–802, 2015.

VALICENTE, Fernando H; BARRETO, Marliton R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 639–644, 2003.

VALICENTE, Fernando H; MOURÃO, André H C. Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide. **Neotropical entomology**, v. 37, n. 6, p. 702–708, 2008.

VALICENTE, Fernando H; SOUZA, I R P. Cultivo e preparo de *Bacillus thuringiensis* para macroscopia eletrônica de varredura. 2004, [S.l.]: In: **Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 25.; Simpósio Brasileiro**, 2004.

VALICENTE, Fernando Hercos; FONSECA, Marta Martins. Susceptibilidade da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 01, 2010.

VAN FRANKENHUYZEN, Kees; TONON, Amanda. Activity of *Bacillus thuringiensis* cyt1Ba crystal protein against hymenopteran forest pests. **Journal of invertebrate pathology**, v. 113, n. 2, p. 160–162, 2013.

WHITELEY, H R; SCHNEPF, H Ernest. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 549–576, 1986.

ZANETTI, Ronald *et al.* An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. **Forests**, v. 5, n. 3, p. 439–454, 2014.

ARTIGO 2 – RNA interferente como ferramenta de controle de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) com dsRNA do gene *v-atpase a*

Normas de formatação NBR 6022 (ABNT 2003) (Versão preliminar)

Wesley Pires Flausino Máximo¹, Déborah Heloísa Bittencourt Machado¹, Kalyinka Gabriela do Livramento¹, Ronald Zanetti, Newton Portilho Carneiro³, Luciano Vilela Paiva¹

¹Laboratório Central de Biologia Molecular, Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, Brasil;

²Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, Brasil;

³Núcleo de Biologia Aplicada, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), MG, Brasil;

RESUMO

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* são consideradas uma das principais pragas florestais no Brasil. O método mais utilizado para o controle deste inseto praga é o químico, considerado danoso pelos efeitos causados ao meio ambiente e a organismos não alvo. Métodos alternativos de controle estão sendo pesquisados com maior frequência nos centros e institutos de pesquisa. Uma estratégia que tem ganhado destaque como potencial método de controle de pragas é o mecanismo de interferência mediado por RNA (RNAi). O RNAi é um método de silenciamento gênico pós transcricional altamente específico, dado o seu mecanismo de ação por complementaridade de ácidos ribonucleicos e pela eficiência na indução de mortalidade em diversos bioensaios laboratoriais. O objetivo deste trabalho foi conduzir bioensaios de mortalidade em operárias forrageadoras de *Atta sexdens* via alimentação com o gene da *v-atpase a* proveniente da transformação de *Escherichia coli* linhagem HT115. O experimento foi baseado na adição de suspensões de HT115 contendo *ds-vatpase a* sobre dietas artificiais semissólidas e os tratamentos controle foram dietas contaminadas com suspensões de *E. coli* HT115 sem dsRNA e dieta molhada apenas água destilada. As formigas alimentadas com as bactérias contendo *ds-vatpase a* levaram às maiores taxas de mortalidade (45% a 69%), significativamente maiores que as observadas nos tratamentos controle (20% a 30%). Acredita-se que as colônias provenientes da transformação estavam expressando o gene da *v-atpase a* em quantidades suficientes para causar mortalidade em *Atta sexdens*, e que este gene seja de importância vital para a sobrevivência das formigas.

Palavras-chave: V-ATPase A. Transformação de *E. coli*. Inseto praga.

ABSTRACT

Leaf-cutting ants of the *Atta* genus are considered one of the main forest pests in Brazil. The most used method to control this insect pest is the chemical, considered harmful by the effects caused to the environment and to non-target organisms. Alternative methods of control are being researched more frequently in research centers and institutes. One strategy that has gained prominence as a potential method of pest control is the RNA-mediated interference mechanism (RNAi). RNAi is a highly specific post-transcriptional gene silencing method, given its mechanism of action for complementing ribonucleic acids and for the efficiency in inducing mortality in several laboratory bioassays. The objective of this work was to conduct mortality bioassays in foraging workers of *Atta sexdens* via feeding with the *v-atpase* gene from the transformation of *Escherichia coli* strain HT115. The experiment was based on the addition of HT115 suspensions containing *ds-vatpase a* on semi-solid artificial diets and the control treatments were diets contaminated with *E. coli* HT115 suspensions without dsRNA and a wet diet with only distilled water. Ants fed with bacteria containing *ds-vatpase* led to higher mortality rates (45% to 69%), significantly higher than those observed in control treatments (20% to 30%). Colonies from transformation are believed to be expressing the *v-atpase a* gene in sufficient quantities to cause mortality in *Atta sexdens*, and that this gene is of vital importance for the survival of ants.

Keywords: V-ATPase A. *E. coli* transformation. Insect pest.

1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* são consideradas uma das principais pragas florestais, podendo causar prejuízos diretos e indiretos, como a desfolha total e consecutiva de culturas. Dentre as principais culturas atacadas destacam-se o pinus e o eucalipto. Projeções de danos causados por desfolha sugerem um prejuízo de U\$8,26 por árvore de eucalipto destruída, e o número de árvores destruídas por ano pode chegar a 1,2 bilhão para uma média de quatro saúveiros adultos por hectare (DELLA LUCIA, 2011).

O método mais utilizado para o controle de formigas cortadeiras é o químico, por meio do uso de iscas granuladas tóxicas consideradas como o método mais eficiente, econômico e prático. Apesar da ampla utilização deste método, algumas questões têm sido levantadas, como a bioacumulação de resíduos no solo e em lençóis freáticos, além do risco de ação em organismos não alvo (BEDOR *et al.*, 2009; TEIXEIRA; SANTOS, 2008). Em 2004, o Brasil tornou-se signatário da Convenção de Estocolmo a respeito de poluentes orgânicos persistentes (POPs), e a utilização de muitos compostos foi proibida, entre eles o endossulfam e o dodecacloro, ambos substituídos pela sulfluramida (MMA, 2014a, MMA, 2013c).

A sulfluramida encontra-se no grupo do Ácido Perfluorooctano Sulfônico (PFOS), e faz parte de um grupo de novas substâncias com características tóxicas peculiares, tanto para o meio ambiente, quanto para a saúde humana (CONVENTION, 2009; DE BRITTO *et al.*, 2016). O Brasil é um dos países que utiliza a sulfluramida como isca, entretanto alternativas viáveis, menos agressivas ao meio ambiente e eficientes no controle de formigas cortadeiras vem sendo buscadas (MMA, 2014a).

Devido a característica de supressão gênica, o RNA interferente (RNAi) vem sendo colocado como uma ferramenta promissora e sustentável para o controle de insetos praga, uma vez que se trata de uma tecnologia altamente direcionada e específica, agindo a nível de complementaridade de ácidos nucleicos (GU; KNIPPLE, 2013; ULRICH *et al.*, 2015). Diversos trabalhos têm demonstrado a ação do RNAi em insetos, como *Diabrotica virgifera virgifera* (BAUM *et al.*, 2007), *Helicoverpa armigera* (MAO *et al.*, 2007), *Solenopsis invicta* (VANDER MEER; CHOI, 2013), *Bemisia tabaci* (THAKUR *et al.*, 2014), entre outros insetos.

O mecanismo de RNAi é um processo de regulação da expressão gênica natural em eucariotos e consiste no silenciamento gênico pós transcricional (PTGS) através da degradação de mRNAs desencadeada pela presença de RNAs dupla fita (dsRNA) homólogos ao gene endógeno (CASTEL; MARTIENSSEN, 2013; HANNON, 2002).

Basicamente, após as moléculas de dsRNA entrarem em contato com as células, são clivadas por ribonucleases (RNases) do tipo III, conhecidas como Dicer, em pequenos RNAs de interferência (siRNA), que possuem um tamanho de cerca de 20 a 25 nucleotídeos. Estes siRNA são reconhecidos pelo complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) que contém outras enzimas denominadas Argonautas. Estas enzimas são responsáveis por eliminar a fita senso dos siRNAs e utilizar a fita antisenso como um guia para reconhecer mRNAs homólogos ao gene alvo e promover sua clivagem (LAM *et al.*, 2015; MEISTER; TUSCHL, 2004).

Diversos parâmetros devem ser levados em consideração para o sucesso desta técnica no controle de insetos-praga, tais como a seleção do gene alvo e o método de entrega do dsRNA aos insetos (NANDETY *et al.*, 2015). O método de entrega do dsRNA pode ser realizado tanto via injeção quanto via ingestão. Os métodos de entrega via ingestão podem ser feitos através do desenvolvimento de culturas transgênicas expressando o dsRNA, de aplicação tópica ou do incremento de iscas. Entretanto, as últimas abordagens requerem a produção de uma grande quantidade de dsRNA homólogo ao gene alvo, o que torna o processo oneroso (RATZKA *et al.*, 2011; ZHANG; LI; MIAO, 2013).

A produção de dsRNA via bactérias tem sido empregada para se obter grandes quantidades de forma econômica e sustentável (NEWMARK *et al.*, 2003). Linhagens de *Escherichia coli* HT115 (DE3) possuem uma mutação no gene codificador da ribonuclease III (RNase III), além de possuírem o gene codificador da RNA polimerase T7. Desta forma são capazes de produzir dsRNA em larga escala e custo baixo quando comparada com as demais estratégias (ONGVARRASOPONE; ROSHORM; PANYIM, 2007; THAMMASORN *et al.*, 2015).

O gene da *v-atpase a* é um candidato em potencial para o silenciamento em insetos, pois, as ATPases vacuolares (V-ATPases) são complexos que funcionam como bombas de prótons H⁺ para a produção de ATP (FORGAC, 2007). A principal função deste complexo é acidificar o pH de membranas celulares como os endossomos, lisossomos, vesículas de Golgi, vesículas secretoras e membranas plasmáticas de diversos tipos de células (FORGAC, 2007; MELLMAN, 1992). As alterações nos níveis de expressão deste gene podem impactar no metabolismo energético das células e causar um desbalanceamento de prótons capaz de provocar modificações nas condições favoráveis de pH necessárias para o funcionamento de vesículas e do tráfego de moléculas através da membrana.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi transformar bactérias *E. coli* HT115 (DE3) com plasmídeo pL4440 contendo cópia do gene *v-atpase* a para sintetizar o dsRNA visando induzir a interferência mediada por RNA em formigas forrageadoras de *Atta sexdens*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local dos experimentos

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas e no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.2 Coleta, criação e manutenção da colônia de *Atta sexdens*

Para o estabelecimento das colônias *in vitro*, rainhas de *A. sexdens* foram coletadas em época de revoada no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA) no ano de 2014. A criação das colônias ocorreu em condições controladas de temperatura e umidade relativa do ar ($23 \pm 2^\circ\text{C}$ e 70%, respectivamente). A limpeza das colônias ocorreu semanalmente e as formigas foram alimentadas com folhas de espécies vegetais diariamente.

2.3 Transformação de bactérias *Escherichia coli* linhagem HT115 para produção de dsRNA

As bactérias e o plasmídeo pL4440 utilizados para a transformação foram cedidos pelo pela Embrapa Milho e Sorgo localizada na região de Sete Lagoas (MG).

O RNA total de forrageadoras de *A. sexdens* foi extraído mediante o reagente TRIzol[®] (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA total foi tratado com o kit TURBO[™] DNase (Invitrogen) para remoção de possíveis contaminação com DNA e qualidade do RNA foi avaliada após eletroforese em gel de agarose (1,0%). O cDNA foi sintetizado utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. Estes cDNAs foram utilizados com templates para PCR utilizando primers específicos para amplificar um fragmento da *v-atpase* *a* de 227pb. Posteriormente o fragmento amplificado foi eluído e purificado do gel de agarose (1,0%). A clonagem ocorreu no vetor pL4440, utilizando as enzimas de restrição BGL II e XBAI. A enzima utilizada para realizar a reação de ligação foi a DNA T4 ligase.

A transformação das bactérias *E. coli* HT115 (DE3) ocorreu de acordo com o protocolo da Invitrogen (One Shot® TOP10 Competent Cells). Os antibióticos utilizados foram a ampicilina e a tetraciclina. Para a produção do ds- *v-atpase a* 5mL das colônias crescidas em meio LB (*Lúria Bertani*) líquido mais os antibióticos foram incubados overnight a 37°C em shaker por 200 rpm. Dos 5mL foram retirados 1mL e adicionados em 100mL de meio LB fresco (contendo os antibióticos ampicilina e tetraciclina) e incubados por mais três horas a 37°C sob agitação de 200 rpm. Após a incubação de três horas foi adicionado 0,4mM de IPTG e incubados novamente por mais quatro horas nas mesmas condições anteriores. A densidade óptica (OD) foi medida até 0,6. Alíquotas de 2mL destas bactérias foram separadas em microtubos e mortas a 80°C por 20 minutos. Após a submissão a alta temperatura, estas foram armazenadas a -20°C para posterior utilização.

2.4 Bioensaios de mortalidade com formigas forrageadoras

O bioensaio de mortalidade via alimentação das formigas forrageadoras foi conduzido com dieta semissólida composta por 50 g de glicose, 10g de extrato de levedura, 10 g de peptona bacteriológica e 15 g de ágar para cada 1,0 L de H₂O destilada.

O experimento foi conduzido em placas de Petri de vidro forradas com papel filtro, e cada placa recebeu um pedaço de 1,0 cm³ da dieta. Nos três primeiros dias de experimento as dietas foram molhadas com 50 µL de suspensões de HT115 contendo *ds-v-atpase a* (HT115+VATPase Col.1, HT115+VATPase Col.5 e HT115+VATPase Col.8), ou HT115 sem produzir dsRNA (HT1 e HT2) (controle negativo do dsRNA) ou H₂O (controle negativo da bactéria). Após este período, apenas a dieta semi-sólida foi fornecida sem nenhuma solução até o fim do bioensaio. O experimento foi conduzido por 15 dias, sendo que a avaliação da mortalidade ocorreu diariamente. O papel filtro e a dieta foram trocados diariamente com o objetivo de se evitar contaminações.

As placas foram mantidas em BOD a uma temperatura de 23 ± 2°C e uma umidade relativa de 70± 10%. O número de formigas vivas foi contado a cada 24 h e as formigas mortas retiradas da placa. O experimento foi inteiramente casualizado contendo três tratamentos (bactérias HT115 contendo o gene VATPaseA) e três tratamentos controle (um tratamento contendo H₂O ultrapura e dois tratamentos com duas colônias distintas de HT115 sem o gene VATPaseA). Para cada tratamento foram realizadas quatro repetições contendo 20 insetos em cada repetição.

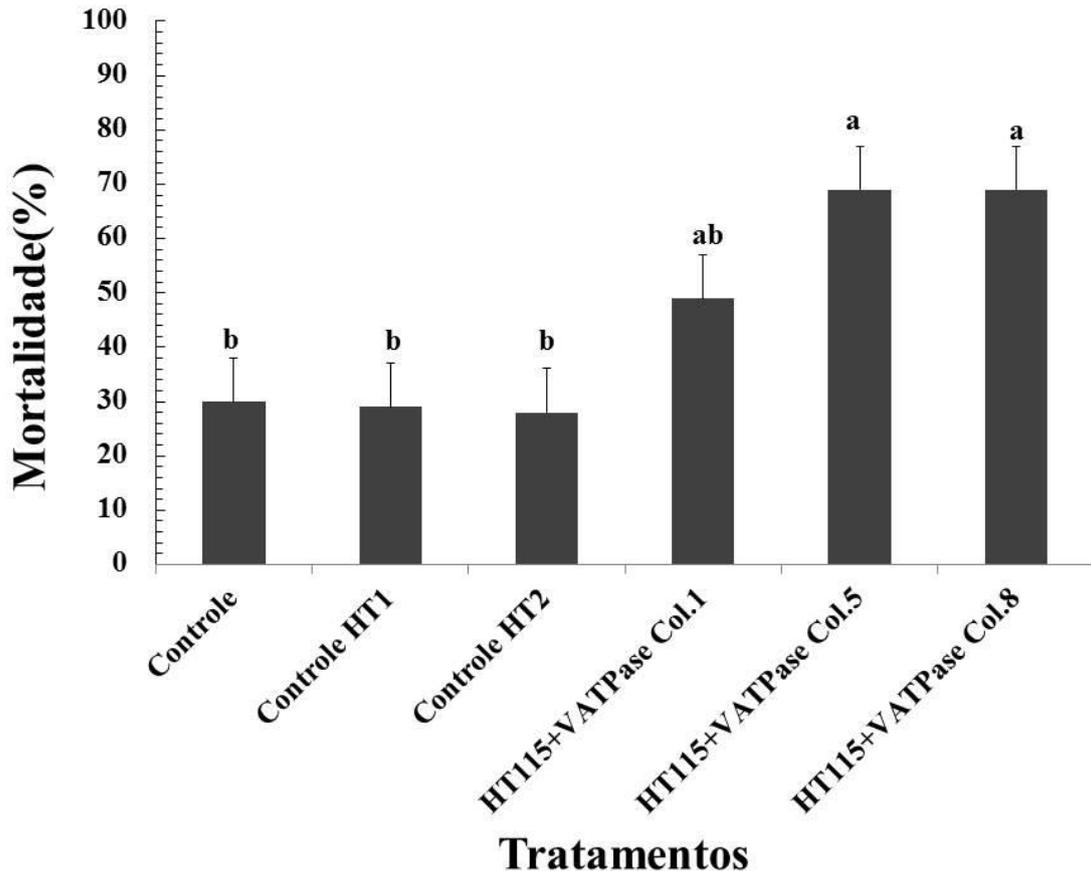
2.5 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas referentes aos bioensaios de mortalidade foram feitos os testes de média ANOVA (Tukey) e a análise de sobrevivência de Weibull realizada no software R (TERRY M. THERNEAU, 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença entre os tratamentos ($p < 0,05$). As colônias HT115+VATPase Col.5 e HT115+VATPase Col.8 exibiram médias de mortalidade de 69% e foram estatisticamente iguais. O tratamento HT115+VATPase Col.1 induziu uma mortalidade de 49%. Tanto os tratamentos controle com as HT115 sem o gene da V-ATPase (HT1 e HT2) quanto o tratamento controle contendo H₂O ultrapura foram estatisticamente iguais. O tratamento controle contendo H₂O exibiu uma média de mortalidade de 30% e os tratamentos HT115 (1) e HT115 (2) exibiram médias de mortalidade de 29% e 28%, respectivamente (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Médias de mortalidade de formigas forrageadoras *Atta sexdens* alimentadas com dsRNA do gene *v-atpase a* e um controle negativo contendo H₂O. Os tratamentos Controle, Controle HT1 e Controle HT2 tratam-se de tratamentos que não continham o gene V-ATPase. HT115+VATPase Col.1, HT115+VATPase Col.5 e HT115+VATPase Col.8 tratam-se de colônias provenientes da transformação de *Escherichia coli* HT115 (DE3).



Legenda: Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora, 2019.

Outros trabalhos também estudaram o RNAi como uma ferramenta para controle de insetos. A injeção em adultos de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) de dsRNA homólogo ao gene neuropeptídeo pirocinina (PK), produzido e isolado de *E. coli* HT115, demonstrou que a mortalidade dos insetos foi quase duas vezes maior que o tratamento controle (PK 19,0% vs GFP 9,6%), entretanto os resultados não foram estatisticamente significativos (AHN *et al.*, 2019).

O gene do citocromo P450 (*cyp6ae14*) foi localizado em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), e está diretamente ligado a detoxificação do metabólito secundário gossipol em plantas de algodão. Ao silenciar este gene em larvas de *H. armigera* via RNAi

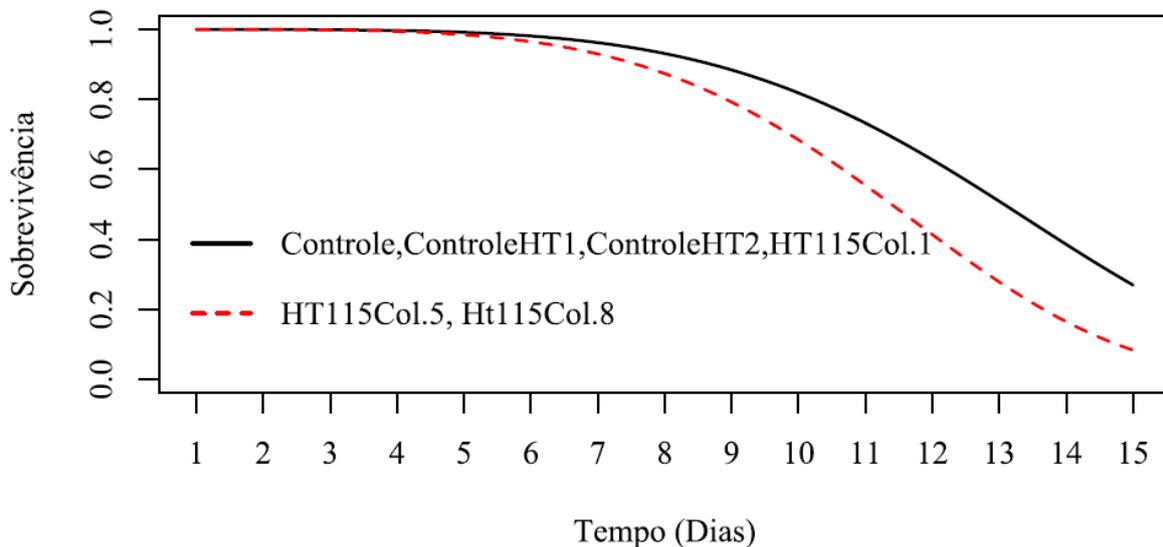
estes insetos não foram capazes de realizar a desintoxicação, e como consequência o tamanho do intestino médio foi reduzido e o crescimento das lavras foi retardado (MAO *et al.*, 2007).

O potencial do RNAi contra insetos da ordem Hymenoptera também pôde ser observado em *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: formicidae), também conhecida como formiga-de-fogo, onde foi silenciado o gene *PBAN*, responsável pela biossíntese de feromônios. Este gene foi silenciado via injeção em insetos adultos onde a mortalidade atingida foi de 83% e em pupas onde a mortalidade foi de cerca de 86% (VANDER MEER; CHOI, 2013).

O gene da *proteína de reconhecimento peptidoglicano*, *PGRP – LB* foi nocauteado em formigas operárias de *Camponotus floridanus* (Hymenoptera: Formicidae), além disto, como neste trabalho, as moléculas de dsRNA homólogas ao gene alvo foram produzidas via transformação de *E. coli* linhagem HT115, evidenciando o potencial da produção de dsRNA via bactérias (RATZKA; GROSS; FELDHAAR, 2013).

Nossos resultados sugerem que as linhagens de *E. coli* HT115 são capazes de expressar dsRNA. Entretanto tornam-se necessários testes adicionais de expressão gênica em formigas alimentadas com o ds-*v-atpase a* além da extração do dsRNA das bactérias, com o objetivo de verificar qual a quantidade de dsRNA está sendo produzida e qual seu efeito sob as formigas alimentadas apenas com a molécula. A sobrevivência das formigas alimentadas com as colônias 5 e 8 de *E. coli* HT115+VATPase começou a cair a partir do 6º dia de avaliação. Os controles H₂O, HT1 e HT2 e HT115 Col.1 mantiveram o mesmo padrão na curva de sobrevivência durante os 15 dias de avaliação (Gráfico 2). O fato do tratamento da colônia 1 ter uma curva de sobrevivência diferente das colônias 5 e 8 pode ser provavelmente, devido às diferentes quantidades de *ds-v-atpase a* produzidas por cada colônia. Entretanto este fator só poderá ser confirmado após análises de expressão gênica.

Figura 2 – Curva de sobrevivência de Weibull de operárias forrageadoras de *Atta sexdens* alimentadas com dsRNA do gene *v-atpase a*.



Legenda: O bioensaio contou com um controle contendo H₂O, o controle HT1 e o controle HT2 (controles com *Escherichia coli* sem o gene *v-atpase a*). Avaliação diária durante 15 dias seguidos. Fonte: Da autora, 2019.

Ao se comparar diferentes métodos de entrega de dsRNA para larvas de *Helicoverpa armigera*, sendo estes métodos a microinjeção, a ingestão de moléculas de dsRNA sintetizadas *in vitro* via kit e a ingestão contínua de *E. coli* linhagem HT115 expressando o dsRNA, foi possível observar que o método mais eficiente foi a ingestão contínua de bactérias expressando o dsRNA, onde a população foi reduzida em cerca de 68% (JING; HAN, 2014). O uso de linhagens de *E. coli* HT115 como sintetizadoras de dsRNA é promissor, podendo o RNAi ser utilizado como ferramenta de controle de insetos praga de diversas ordens de insetos em larga escala e de maneira mais econômica. Entretanto, deve se observar fatores como a escolha dos genes alvo, a padronização de um método para a realização dos bioensaios, bem como o método de entrega do dsRNA ao inseto alvo com o objetivo de se otimizar bioensaios laboratoriais e se obter resultados mais precisos sobre o silenciamento gênico.

O gene da *v-atpase* vem sendo frequentemente estudado como um alvo potencial ao silenciamento gênico em insetos. O silenciamento gênico do gene *v-atpase a* foi avaliado em neonatas de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), onde foi possível observar mortalidade de cerca de 85% após seis dias de bioensaio (UPADHYAY *et al.*, 2011). Em outro experimento foram oferecidas plantas de tabaco expressando o gene da *v-atpase a* para neonatas da mosca branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), foi possível observar que o dsRNA expresso pelas plantas causou uma média de mortalidade entre 48% a 62%, sendo

que este resultado foi significativamente maior que o tratamento controle que induziu cerca de 20% de mortalidade (THAKUR *et al.*, 2014). Em estudos com larvas de *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) foi possível observar que dietas contendo dsRNA homólogos aos genes *v-atpase* subunidades a e d foram capazes de reduzir os níveis de mRNA homólogos e levar os insetos a morte (BAUM *et al.*, 2007). Prentice *et al.* (2017) observaram uma mortalidade significativa em *Cylas puncticollis* (Coleoptera: Brentidae) após injeção e ingestão de moléculas de dsRNA homólogos ao gene *v-atpase a*.

4. CONCLUSÃO

Nossos resultados apresentam uma média de mortalidade promissora contra para formigas forrageadoras de *A. sexdens* alimentadas com bactérias *E. coli* HT115 (DE3) transformadas com o gene da *v-atpase a*. Desta forma, é necessário verificar quais colônias estão expressando o dsRNA em maiores níveis para a real constatação da mortalidade. Este bioensaio foi realizado apenas uma vez, desta forma devem ser realizados novos bioensaios para a confirmação dos resultados obtidos. Além disto, outros estudos devem ser conduzidos com o dsRNA extraído da bactéria para se dosar a concentração e analisar o efeito causado em outras castas de formigas *Atta sexdens*.

REFERÊNCIAS

AHN, Seung-Joon *et al.* Microbial-Based Double-Stranded RNA Production to Develop Cost-Effective RNA Interference Application for Insect Pest Management. **International Journal of Insect Science**, v. 11, p. 1179543319840323, 2019.

BAUM, James A *et al.* Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1322, 2007.

BEDOR, Cheila Nataly Galindo *et al.* Vulnerabilidades e situações de riscos relacionados ao uso de agrotóxicos na fruticultura irrigada. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 12, p. 39–49, 2009.

CASTEL, Stephane E; MARTIENSSEN, Robert A. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 2, p. 100, 2013.

CONVENTION, Secretariat of the Stockholm. COP4-Governments unite to step-up regulation on global DDT reliance and add nine new chemicals under international treaty.

Geneva: Stockholm Convention Secretariat, 2009.

DE BRITTO, Júlio Sérgio *et al.* Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Research in Environmental Studies**, v. 3, p. 11–92, 2016.

DELLA LUCIA, T M C; SOUZA, D J. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. Formigas-Cortadeiras da biotecnologia ao manejo. **Editora UFV**. Viçosa, Brazil, p. 13–26, 2011.

FORGAC, Michael. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 8, n. 11, p. 917, 2007.

GU, Liuqi; KNIPPLE, Douglas C. Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies. **Crop Protection**, v. 45, p. 36–40, 2013.

HANNON, Gregory J. RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 244, 2002.

LAM, Jenny K W *et al.* siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 4, p. e252, 2015.

MAO, Ying-Bo *et al.* Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1307, 2007.

MEISTER, Gunter; TUSCHL, Thomas. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 343, 2004.

MELLMAN, I. The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. **Journal of Experimental Biology**, v. 172, n. 1, p. 39–45, 1992.

MMA. Grupo de Trabalho Interinstitucional (GTI) do Plano Nacional de Implementação da Convenção de Estocolmo: **Inventário Nacional Preliminar de Estoques e Resíduos de Agrotóxicos POPs (documento preliminar)**. 2014a.

MMA. **Inventário Nacional Preliminar de Novos Poluentes Orgânicos Persistentes (Novos POPs) de Uso Industrial**. 2013c.

NANDETY, Raja Sekhar *et al.* Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. **Bioengineered**, v. 6, n. 1, p. 8–19, 2015.

NEWMARK, Phillip A *et al.* Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. suppl 1, p. 11861–11865, 2003.

ONGVARRASOPONE, Chalernporn; ROSHORM, Yaowaluck; PANYIM, Sakol. A simple and cost effective method to generate dsRNA for RNAi studies in invertebrates. **Science Asia**, v. 33, n. 1, p. 35–39, 2007.

PRENTICE, Katterinne *et al.* RNAi-based gene silencing through dsRNA injection or ingestion against the African sweet potato weevil *Cylas puncticollis* (Coleoptera: Brentidae). **Pest management science**, v. 73, n. 1, p. 44–52, 2017.

RATZKA, Carolin *et al.* Immune response of the ant *Camponotus floridanus* against pathogens and its obligate mutualistic endosymbiont. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 8, p. 529–536, 2011.

RATZKA, Carolin; GROSS, Roy; FELDHAAR, Heike. Systemic gene knockdown in *Camponotus floridanus* workers by feeding of dsRNA. **Insectes sociaux**, v. 60, n. 4, p. 475–484, 2013.

TEIXEIRA, Maria Lucia França; SANTOS, Marcus Nascimento. Atratividade da isca granulada de polpa de fruto do jatobá para saúva-limão, no campo. **Ciencia rural**, v. 38, n. 4, p. 907–911, 2008.

TERRY M. THERNEAU, Patricia M. Grambsch. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model R*. Disponível em: <url: <https://CRAN.R-project.org/package=surviva>>. , 2000

THAKUR, Nidhi *et al.* Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase A gene. **PLoS one**, v. 9, n. 3, p. e87235, 2014.

THAMMASORN, Thitiporn *et al.* Large-scale production and antiviral efficacy of multi-target double-stranded RNA for the prevention of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. **BMC biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 110, 2015.

ULRICH, Julia *et al.* Large scale RNAi screen in *Tribolium* reveals novel target genes for pest control and the proteasome as prime target. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 674, 2015.

UPADHYAY, Santosh Kumar *et al.* RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. **Journal of biosciences**, v. 36, n. 1, p. 153–161, 2011.

VANDER MEER, Robert K; CHOI, Man Yeon. Formicidae (ant) control using double-stranded RNA constructs. **Google Patents**, 2013.

ZHANG, Hao; LI, Hai-Chao; MIAO, Xue-Xia. Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. **Insect science**, v. 20, n. 1, p. 15–30, 2013.